

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO E MONOGRAFIA

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Diana Isabel Heitor Delgado

LISBOA 2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO
LABORATÓRIO NOVA ERA-LUZ

ORIENTAÇÃO: DRA. MARGARIDA MENDES

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Diana Isabel Heitor Delgado

LISBOA 2011



No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, foi solicitado pela Coordenadora e Orientadores do Mestrado a realização de um estágio nas valências de Bioquímica, Imunologia e Hematologia.

Assim, elaborei este relatório que tem como objetivo sistematizar a informação disponível e demonstrar a boa compreensão das atividades realizadas. Com isto pretendo demonstrar os conhecimentos que me permitam completar com êxito o Mestrado em Análises Clínicas.



ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	8
BREVE DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	9
DESCRIÇÃO GERAL DO ESTÁGIO - RESUMO	11
GENERAL DESCRIPTION OF SUPERVISED PRACTICAL TRAINING - ABSTRACT	12
AMOSTRAS BIOLÓGICAS ESTUDADAS.....	14
SANGUE.....	14
URINA.....	15
CIRCUITO ANALÍTICO	16
AMOSTRAS DE URINA	16
AMOSTRAS DE SANGUE	16
FASES DO CIRCUITO	16
COLHEITAS	18
COLHEITAS DE SANGUE	18
COLHEITAS DE URINA	18
CONSERVAÇÃO	19
TRANSPORTE	19
BIOQUÍMICA	20
EQUIPAMENTOS ANALÍTICOS - MÉTODOS E TÉCNICAS UTILIZADOS.....	20
AUTION MAX AX-4280.....	20
ANÁLISE DO SEDIMENTO URINÁRIO – MICROSCÓPIO ÓTICO.....	24
OLYMPUS AU400.....	26
TESTES REALIZADOS.....	26



IMUNOLOGIA.....	46
EQUIPAMENTOS ANALÍTICOS - MÉTODOS E TÉCNICAS UTILIZADOS.....	46
ADVIA CENTAUR	46
TESTES REALIZADOS.....	48
VIDAS – BIOMERIEUX.....	65
TESTES REALIZADOS.....	65
MINICAP	70
ELETROFORESE CAPILAR.....	70
TESTE PARA DETEÇÃO DA BRUCELOSE – BRUCELLOSLIDE TEST.....	73
TESTE PARA DETEÇÃO DE TREPONEMA PALLIDUM – VDRL RPR NOSTICON II.....	74
TESTE PARA DETEÇÃO DE FATOR REUMATOIDE – WALLER ROSE POLYARTTEST FUMOZE	74
HEMATOLOGIA	75
EQUIPAMENTOS ANALÍTICOS - MÉTODOS E TÉCNICAS UTILIZADOS.....	75
SYSMEX XT 180i.....	75
HEMOGRAMAS	75
HEMATOPOIESE	75
GLÓBULOS VERMELHOS (GV) OU ERITRÓCITOS.....	77
GLÓBULOS BRANCOS OU LEUCÓCITOS	77
PLAQUETAS	84
CITOMETRIA DE FLUXO	85
CONTAGEM E DIFERENCIAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE GLÓBULOS BRANCOS ..	86
CONTAGEM DE GLÓBULOS VERMELHOS E PLAQUETAS.....	86
ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS.....	86



SYSMEX CA 500	87
COAGULAÇÃO	88
TEMPO DE TROMBOPLASTINA (TP)	90
TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (APTT).....	91
FIBRINOGENIO	91
ADAMS A1C HA8160	92
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESSÃO.....	92
VESMATIC 30/30 PLUS	93
VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO GLOBULAR.....	93
HB GOLD	95
CONTAGEM DE RETICULÓCITOS	96
CONTAGEM DE PLAQUETAS (CÂMARA DE PLAQUETAS).....	97
CRIOAGLUTININAS	97
CRIOGLOBULINAS	98
TIPAGEM SANGUÍNEA – SISTEMA AB0 e Rh	98
ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS E COLORAÇÃO DE MAY-GRÿNWALD-GIEMSA	99
PESQUISA DE CÉLULAS FALCIFORMES.....	99
TEMPO DE HEMORRAGIA- MÉTODO DE DUKE.....	100
TEMPO DE COAGULAÇÃO	100
CONTROLO DE QUALIDADE	101
OLYMPUS AU 400	103
AUTION MAX AX – 4280.....	103
ADVIA CENTAUR.....	103
VIDAS	104



MINICAP	104
SYSMEX XT 180i	104
SYSMEX CA 500	104
ADAMS A1C HA8160	104
VESMATIC 30/30 PLUS	104
HB GOLD	104
CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO TÉCNICA	105
CONCLUSÃO.....	106
BIBLIOGRAFIA.....	107
MONOGRAFIA – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO EBV	109



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Quadro de Pessoal	9
Figura 2 - Organograma.....	10
Figura 3 - Cronograma de Estágio	10
Figura 4 - AUTION MAX AX-4280.....	20
Figura 5 - OLYMPUS AU400	26
Figura 6 – Ensaio Imunoturbidimétrico	43
Figura 7 - ADVIA CENTAUR.....	46
Figura 8 - VIDAS	65
Figura 9 - MINICAP	70
Figura 10 - Representação em bandas e gráfico de uma eletroforese normal das proteínas ...	73
Figura 11 – SYSMEX XT 180i.....	75
Figura 12 – Processo de formação das células sanguíneas	77
Figura 13 - Eritrócito	77
Figura 14 – Processo de Formação dos Leucócitos e dos Eritrócitos.....	78
Figura 15 - Neutrófilo.....	79
Figura 16 - Formação do Linfócito maduro	81
Figura 17 - Macrófago	83
Figura 18 - Formação dos monócitos	84
Figura 19 - Monócitos.....	84
Figura 20 – Esquema da Citometria de Fluxo.....	85
Figura 21 - SISMEX CA 500	87
Figura 22 – Cascata da Coagulação.....	89
Figura 23 – Fibrinólise.....	90
Figura 24 - ADAMS A1C HA8160	92
Figura 25 - VESMATIC 30/30 PLUS	93
Figura 26– Fenómeno de Rouleux.....	94



Figura 27 – HB GOLD	95
Figura 28 – Exemplo de um gráfico normal	96



AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Faculdade de Farmácia por ter concebido e posto em prática este mestrado.

À Prof.^a Doutora Cristina Marques, como Coordenadora do mestrado.

A todo o quadro de pessoal do Laboratório Nova Era, em particular à Orientadora do estágio, Dr.^a Margarida Mendes.

A todos os Docentes, pelo interesse e conhecimentos que nos dedicaram e transmitiram.

A todos os meus familiares, em especial aos meus pais, tios, padrinhos e primas pelo apoio e confiança demonstrados para comigo.

A todos os meus amigos, pelo apoio e motivação que sempre me deram.

Sem eles, seria muito mais difícil chegar até aqui.

A Todos, os meus sinceros agradecimentos

BREVE DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

A Clínica Médica e Laboratorial Nova Era iniciou a sua atividade nas atuais instalações em maio de 1999. Destacou-se nas Laranjeiras por se tratar de um laboratório construído de raiz e, ao mesmo tempo, com uma área dedicada às consultas médicas de diferentes especialidades.

O atual Diretor Técnico do laboratório, o Dr. José Luís Viana (Especialista em Análises Clínicas), encontra-se no Laboratório desde 1999.

Em maio de 2007 deu-se um novo passo na Clínica Médica e Laboratorial Nova Era mediante a sua integração no São João de Deus | Grupo de Saúde.

O laboratório acima referido tem o quadro de pessoal representado no gráfico e recebe diariamente uma média de 150 amostras.

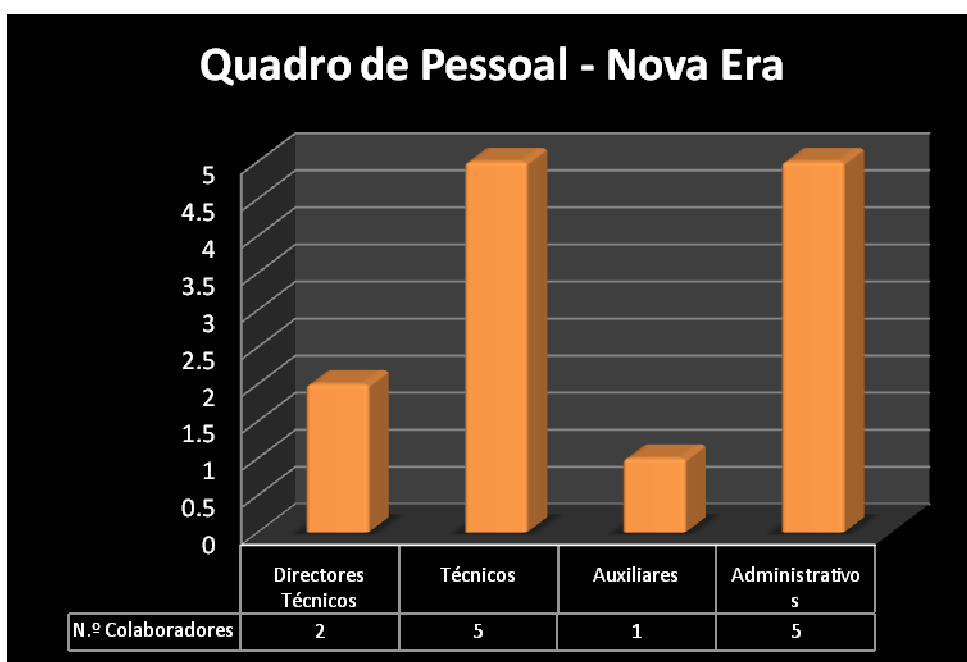


Figura 1- Quadro de Pessoal

A Clínica Nova Era, mais detalhadamente o Laboratório de Análises Clínicas, está organizada estruturalmente da seguinte forma:

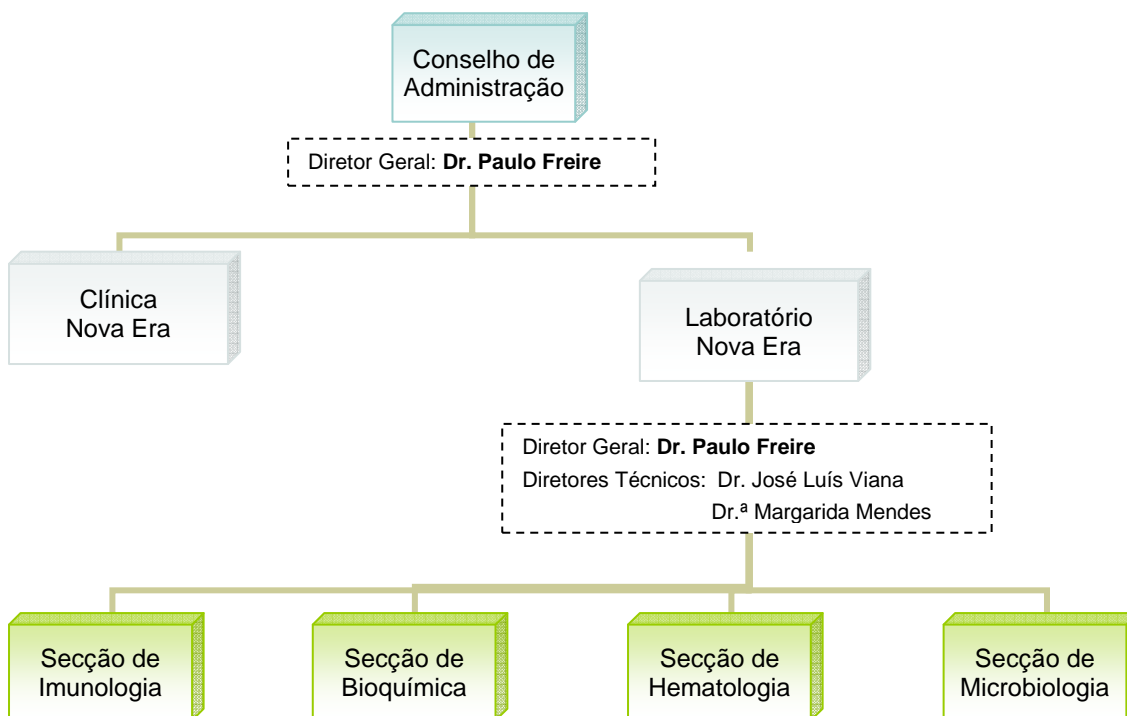


Figura 2 - Organograma

No decorrer do estágio, realizaram-se as atividades indicadas no cronograma:

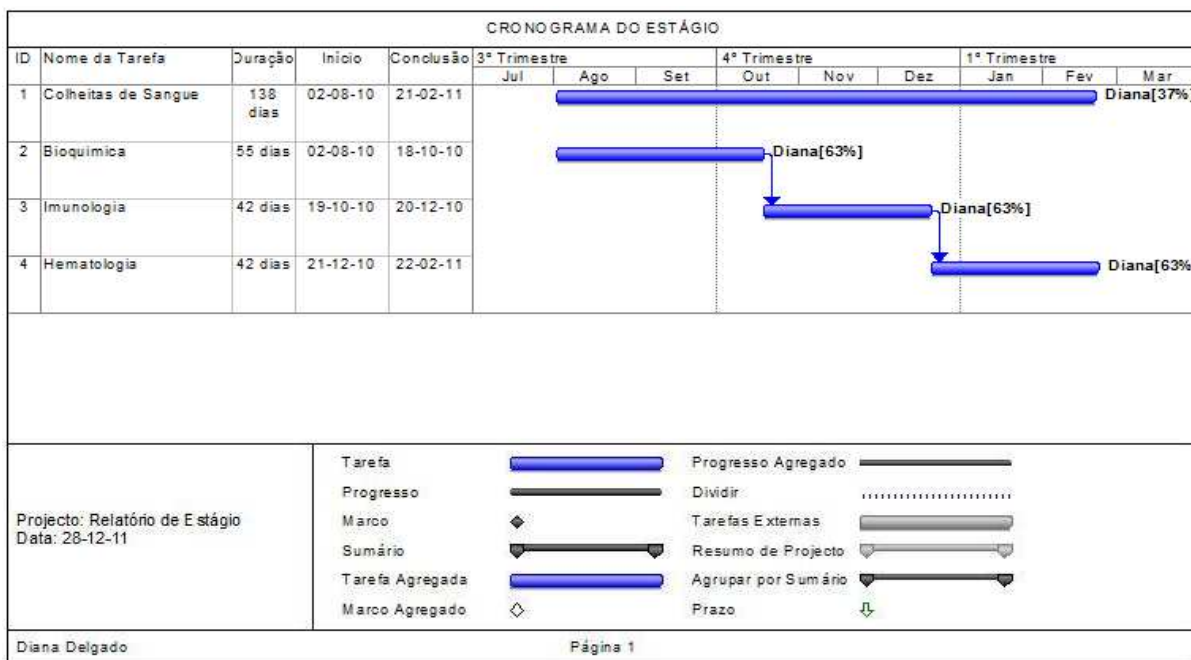


Figura 3 - Cronograma de Estágio



DESCRIÇÃO GERAL DO ESTÁGIO - RESUMO

No âmbito deste mestrado, realizei este estágio que se dividiu em quatro partes:

- Colheitas – Fase pré analítica;
- Análises Bioquímicas a amostras de sangue e urina;
- Análises Imunológicas a amostras de sangue;
- Análises Hematológicas a amostras de sangue;

No dia 2 de agosto de 2010, iniciou-se o estágio, às 8:00, na Sala de Colheitas deste laboratório, onde tudo correu dentro da normalidade, sendo que a metodologia aplicada foi a punção venosa com agulha e seringa.

Houve uma permanência na Sala de colheitas das 8:00 às 11:00h, todos os dias, durante todo o tempo em que decorreu o estágio (de 2 de agosto a 22 de fevereiro).

Após a realização das colheitas de sangue, durante cerca de três meses, das 11:00 às 17:00, efetuaram-se análises bioquímicas a amostras de sangue e urina. Estas análises realizaram-se através do uso de dois equipamentos, o Aution Max AX4280 (realiza a análise química das urinas frescas através de reações químicas que ocorrem nas áreas da tira de teste e provocam alterações da cor, as quais são depois lidas por reflectância no aparelho) e o Olympus AU400 (no qual a metodologia usada na medida da maioria dos analitos é a espectrofotometria).

No quarto e quinto mês, durante cerca de 5 horas diárias, realizaram-se análises imunológicas, através do uso de três equipamentos, o Advia Centaur (usa como metodologia os ensaios imunoenzimáticos e a tecnologia quimiluminométrica), o VIDAS (utiliza uma associação de métodos imunoenzimáticos com uma deteção final em fluorescência) e o MiniCap (eletroforese capilar para realização de proteinogramas).

No sexto e sétimo mês, durante cerca de 5 horas diárias, realizaram-se análises hematológicas em amostras de sangue, através do uso de cinco aparelhos, o Sysmex XT1800i (utiliza a tecnologia de citometria de fluxo para a realização de hemogramas), o Sysmex Ca500 (utilizado para a realização de análises à coagulação sanguínea, que utiliza uma metodologia de deteção de luz difusa e um método colorimétrico), o Adams A1C HA8160 (utilizado para o doseamento da hemoglobina glicada, através de cromatografia líquida de alta pressão), o VesMatic 30/30 Plus (método mecânico e leitura por infravermelhos, para determinação da velocidade de sedimentação) e o Hb



Gold (realização de eletroforeses de hemoglobinas por cromatografia de troca catiónica).

A realização deste estágio permitiu aplicar de forma sistematizada os conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado, produzindo os dados necessários para fornecer os resultados das análises aos utentes e ajudando os clínicos a estabelecer diagnósticos.

GENERAL DESCRIPTION OF SUPERVISED PRACTICAL TRAINING - ABSTRACT

Under this master, I went through a supervised practical training which was divided into four parts:

- Sample collection – Preanalytical phase;
- Biochemical analysis of blood samples and urine;
- Immunologic analysis of blood samples;
- Hematological analysis of blood samples.

On August 2, 2010, the practical training began at 8:00 in the laboratory, where everything went within normal limits. The methodology applied was venipuncture using needle and syringe.

There was a permanence in the laboratory from 8:00 to 11:00 every day, throughout the entire duration of the training (from 2 August to February 25).

After blood and urine sample collection, and for about three months, from 11:00 to 17:00, biochemical analyses were carried out on samples of blood and urine. These tests were performed by using two devices, the AX4280 Aution Max (performs chemical analysis of fresh urine by chemical reactions that occur in the areas of test strip and cause discoloration, which are then read by reflectance device) and the Olympus AU400 (in which the methodology used in the measurement of most analytes is spectrophotometry).

In the fourth and fifth months, for about 5 hours a day, there were immunological analysis, through the use of three devices, the Advia Centaur (used as the methodology and quimioluminometric technology enzyme immunoassays), VIDAS (uses a combination of immunoenzymatic methods with a final detection in fluorescence) and MiniCap (capillary electrophoresis to perform Proteinograms).

In the sixth and seventh month, for about 5 hours a day, hematological tests were performed on samples of blood, through the use of five sets, the Sysmex XT1800i (uses the technology of flow cytometry to perform blood counts), the Sysmex Ca500



(used for the analysis of blood clotting, which uses a methodology for detection of scattered light and a colorimetric method), the A1C Adams HA8160 (used for the determination of glycated hemoglobin by high pressure liquid chromatography), the VesMatic 30/30 Plus (mechanical method and infrared reading, to determine the sedimentation rate) and Hb Gold (performing hemoglobin electrophoresis by cation exchange chromatography).

The conclusion of this training led to the implementation in a systematic way of the knowledge acquired during the master, producing the data needed to provide the analysis results to users and helping to establish clinical diagnoses.



AMOSTRAS BIOLÓGICAS ESTUDADAS

SANGUE

O sangue é um tecido conjuntivo, líquido, constituído por biliões de células suspensas num líquido aquoso. Abastece de oxigénio e nutrientes todas as partes do organismo e remove os produtos residuais para excreção. Fornece também calor ao corpo e ajuda-o a defender-se dos ataques de organismos invasores. Passa por todas as células vivas, distribuindo os nutrientes essenciais e recebendo os produtos de excreção para serem eliminados.

O volume total de sangue no adulto é de 5/ 6 litros, ou 7 a 8% do seu peso corporal. Aproximadamente, 45% do sangue é composto pelos elementos celulares: os glóbulos vermelhos (ou eritrócitos ou hemácias), os glóbulos brancos (ou leucócitos) e as plaquetas (ou trombocitos). Os glóbulos vermelhos contêm a hemoglobina, que transporta o oxigénio; os glóbulos brancos “defendem” o organismo de substâncias estranhas (e.g., agentes infecciosos) e as plaquetas possuem como principal função o controlo de hemorragias⁷.

Os restantes 55% do sangue constituem a porção fluída do mesmo, em que 90% é água e 10% é composto por proteínas (albumina, globulina e fibrinogénio), glícidos, vitaminas, hormonas, enzimas, lípidos e sais minerais. Quando se utiliza um anticoagulante, a fração líquida do sangue é chamada plasma e contém fibrinogénio. Se não for usado qualquer tipo de anticoagulante, é chamada soro e não contém fibrinogénio, uma vez que este foi consumido aquando da formação do coágulo. De uma forma generalista, diz-se que o sangue é composto pelos elementos figurados (células) e por plasma.

Como o sangue circula por todo o corpo, o oxigénio é transportado dos pulmões para os tecidos, os produtos da digestão são absorvidos no intestino e transportados aos diversos tecidos. As células sanguíneas também podem ser transportadas para debelar infeções ou participar na coagulação. Ao mesmo tempo os produtos metabólicos dos tecidos são lançados na corrente sanguínea para que possam ser reutilizados ou excretados, pela pele, rins e pulmões.



URINA

A urina é um líquido orgânico de cor amarelada produzido pelos rins que transporta produtos residuais dissolvidos. Cerca de 95% da urina é constituída por água. O resto é formado principalmente por sais minerais dissolvidos e uma substância denominada de ureia que contém azoto. A ureia é produzida pelos rins e a sua quantidade é regulado por hormonas. Se o sangue estiver excessivamente concentrado, a glândula pituitária aumenta a produção da hormona antidiurética (ADH), o que diminui a quantidade de urina e conserva a água. Se o sangue estiver demasiado diluído os níveis de ADH descem e aumenta a produção de urina. A urina encontra-se isenta de bactérias⁷.

A urina Tipo II ou urina fresca é geralmente requisitada para exames de rotina, sendo preferencialmente feita a análise com a primeira urina da manhã, uma vez que tem como vantagem ser mais concentrada, permitindo assim a deteção de substâncias e elementos figurados que poderão não estar presentes em amostras aleatórias (por estarem diluídas).

O objetivo da urina de 24 horas é permitir detetar alterações de parâmetros bioquímicos específicos, que de outra forma não seriam reveladas. A necessidade de utilização da urina de 24 horas deve-se ao facto de o organismo não excretar todas as substâncias à mesma velocidade. A sua excreção está sujeita a inúmeras interferências, nomeadamente, a dieta alimentar, a atividade física e o *stress*, existindo “picos” de maior libertação das substâncias. Deste modo, efetua-se a colheita de todo o volume de urina eliminado por um período de 24 horas, de forma a abranger a eliminação de todos os elementos em estudo.

CIRCUITO ANALÍTICO

AMOSTRAS DE URINA

As amostras de urina são transportadas ao laboratório de forma e a temperatura adequadas¹, pois a permanência à temperatura ambiente pode levar a alterações, tais como: o aumento do pH devido à degradação da ureia pelas bactérias, levando à produção de amónia; a diminuição da glucose (se presente) pela ação das bactérias; a diminuição dos corpos cetónicos devido à volatilização; a diminuição da bilirrubina pela ação da luz (é fotossensível); o aumento da turvação por proliferação bacteriana e possível precipitação de cristais amorfos e a desintegração dos elementos figurados (eritrócitos, leucócitos e células).

As amostras devem ser corretamente identificadas, sendo possível nessa identificação a distinção entre as urinas frescas e as urinas de 24 horas, de forma a evitar eventuais erros, e devem estar acompanhadas da respetiva requisição preenchida pelo médico requisitante e onde se podem ver as análises pedidas. Aquando da receção da urina, o técnico deve verificar se está corretamente identificada, caso contrário a amostra é rejeitada e a identificação deve ser feita sempre no frasco e nunca na tampa¹².

AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue são transportadas ao laboratório de forma e temperatura adequadas. Devem ser colhidas para tubos que contenham os anticoagulantes específicos ou para tubos sem anticoagulante, sendo posteriormente realizada a preparação da amostra de acordo com as análises requisitadas¹².

FASES DO CIRCUITO

Para se compreender o funcionamento de um laboratório de Análises Clínicas, é necessário o conhecimento de todo o circuito analítico.

O circuito analítico é todo o percurso, de amostras biológicas que tem como finalidade o estudo dos seus constituintes. Divide-se em três fases distintas, sendo que a primeira fase, é a **Fase Pré Analítica**, seguida da **Fase Analítica** e por fim a **Fase Pós Analítica**.

¹ A urina após a colheita deve ser enviada ao laboratório num período máximo de duas horas. Se não for possível há que conservá-la no frio.



A **Fase Pré Analítica** inicia-se através do contacto entre o clínico e o doente, do qual resulta por parte do médico o pedido de análises como meio auxiliar de diagnóstico. Após o pedido que é realizado recorrendo ao preenchimento de requisições, dependendo do fluido corporal e da análise pedida, o técnico de análises clínicas ou o próprio paciente faz a colheita do fluido humano pretendido, sendo os mais frequentes o sangue e a urina.

As colheitas de Sangue, no laboratório Nova Era, são realizadas pelo técnico de análises clínicas e efetuam-se na sala de colheitas do mesmo e nos postos de colheitas. Seguidamente, é realizado o transporte das amostras ao laboratório.

Após a chegada das amostras ao laboratório, procede-se à introdução de dados no sistema informático e preparam-se as amostras¹².

Na **Fase Analítica** realiza-se a análise propriamente dita das amostras em estudo e à medida que os resultados saem, são enviados para o sistema informático utilizado pelo laboratório (sistema e-DeiaLab Slice).

Na **Fase Pós Analítica** realizam-se os cálculos necessários para que o técnico possa dar resultados provisórios e efetuar a validação técnica. Seguidamente realiza-se a validação médica e por último enviam-se os resultados definitivos ao utente ou ao médico requisitante, de forma a este estabelecer um diagnóstico definitivo e realizar uma proposta terapêutica.

O **Fluxo Intra Laboratorial** consiste, na fase pré-analítica, na receção de produtos e requisições, na introdução de dados pessoais e demográficos e no pedido e preparação da amostra. Na fase analítica, faz-se a execução da análise. Na fase pós-analítica, realizam-se cálculos para emissão de resultados provisórios, efetua-se a validação técnica, a validação médica e o envio posterior de resultados definitivos.

Entende-se por validação, a confirmação, através de exames e apresentações de provas objetivas, de que os requisitos específicos, relativos a uma dada utilização, são cumpridos. A validação técnica consiste em validar a execução técnica, os reagentes, os equipamentos e as amostras. A validação médica consiste em avaliar a coerência dos resultados entre si, a coerência dos resultados ao longo do tempo e a coerência dos resultados com a informação clínica.



COLHEITAS

É de extrema importância, seja qual for a análise pedida, que a requisição possua uma identificação correta e inequívoca do doente, informação clínica relevante e que os exames requisitados estejam descritos de forma clara.

A colheita deve ser realizada por pessoal habilitado e treinado a pessoas saudáveis ou doentes, sejam homens, mulheres ou crianças. A quantidade de amostra a colher e o recipiente para a colocar dependem dos estudos que se vão efetuar e dos meios técnicos que se vão usar. O material utilizado deve ser adequado ao pedido e às características do doente/utente.

COLHEITAS DE SANGUE

Para a colheita de amostras de sangue, ao contrário do que pode acontecer com outras amostras orgânicas (como a urina), é imprescindível a intervenção do técnico, o que implica um contacto com o utente. Sendo importante que o técnico lhe transmita confiança e tranquilidade. Quando o utente é uma criança, estes cuidados devem ser reforçados, uma vez que é muito importante conquistar a sua confiança, antes da realização da colheita, para isso é fundamental, explicar-lhe o que se vai suceder.

As amostras de sangue são, normalmente, colhidas de veias. Nalgumas circunstâncias pode recorrer-se a colheitas capilares (pés e dedos das mãos), mais usadas em recém-nascidos. Quando o utente não possui acessos venosos, pode recorrer-se à punção arterial.

COLHEITAS DE URINA

Na primeira urina da manhã, o utente deve urinar quando se levanta para um recipiente limpo cerca de 100 a 200ml. A urina deve ser enviada ao laboratório no máximo duas horas após a colheita.

Uma amostra colhida aleatoriamente pode substituir a primeira urina da manhã, no entanto pode levar à alteração de alguns resultados devido à atividade física e à ingestão de alimentos. Pode estar diluída e dar falsos resultados negativos de proteinúria.

Uma análise a uma urina fresca permite avaliar a capacidade de concentração do rim e, no caso de pesquisa de proteinúria ortostática ou teste de gravidez, é fundamental que seja a primeira urina da manhã.



A colheita de urina é da responsabilidade do utente, embora o técnico possa ter de o instruir sobre o procedimento. No entanto, em caso de doentes algaliados, a responsabilidade é do enfermeiro.

Relativamente à urina de 24 horas cabe ao técnico de análises clínicas instruir o utente como deve proceder para efetuar a colheita desta urina.

Há doseamentos (p ex. as catecolaminas e o ácido vanil-mandélico) que necessitam de um conservante. É o laboratório que o fornece e deverá ser colocado no recipiente de recolha após a primeira micção¹².

CONSERVAÇÃO

Na conservação da amostra é necessário respeitar as normas de higiene e segurança, o tempo e a temperatura adequados ao produto e ao tipo de exame. Deve-se guardar o material potencialmente de risco em áreas especiais e caso a amostra seja deixada à temperatura ambiente, esta exposição não deve ser excessiva. O frigorífico deve estar sempre limpo e organizado.

TRANSPORTE

O transporte deve ser adequado às características da amostra, à análise e à distância a percorrer. As amostras devem estar bem rolhadas e acondicionadas e a temperatura de transporte deve ser o mais próximo possível da temperatura de conservação.

BIOQUÍMICA

EQUIPAMENTOS ANALÍTICOS - MÉTODOS E TÉCNICAS UTILIZADOS

AUTION MAX AX-4280

Este equipamento é usado para a realização de uma análise semiquantitativa e em alguns parâmetros quantitativa à densidade, à turbidimetria ao pH, aos leucócitos, aos nitritos, às proteínas, à glucose, aos corpos cetônicos, ao urobilinogénio, à bilirrubina e ao sangue em amostras de urina



Figura 4 - AUTION MAX AX-4280

fresca.

É um sistema completamente automático, com leitura de código de barras, em que as amostras de urina são pipetadas por uma agulha e posteriormente dispensadas gotas de urina, de modo automático, em tiras-teste (URIFLET S). É necessário para a determinação um volume de 2.0 mL. As tiras-teste são lidas automaticamente pelo aparelho, não sendo necessária a leitura visual, diminuindo assim erros de leitura por parte do técnico. Este aparelho tem a capacidade de analisar 225 amostras/hora e o tempo de reação das tiras-teste é de aproximadamente 60 segundos¹¹.

Tal como referido anteriormente para a realização desta análise usam-se tiras reativas que contêm zonas absorventes, impregnadas com reagentes específicos para cada analito.

Aquando da colocação da amostra de urina fresca nas áreas das tiras, ocorre uma reação química, que produz uma mudança de cor, a qual é detetada pelo método de refração dupla por duas lentes.

Na unidade ótica, são irradiados sobre as zonas de reação da tira-teste, dois comprimentos de onda diferentes (exceto na determinação do sangue que é feita só por um comprimento de onda). A luz refletida é recebida por três detetores e a combinação dos diferentes comprimentos de onda é diferente para cada parâmetro.

Os resultados são automaticamente calculados e posteriormente impressos no relatório em termos de "normal", "neg." "pos." ou valores de concentração. Tal como os resultados obtidos por comparação visual de cor, cada valor impresso corresponde a um intervalo de concentrações definido.

O princípio de cada um dos parâmetros semiquantificados por este equipamento é:

pH

A zona de teste contém os indicadores vermelho de metilo, fenolftaleína e azul de bromotimol, que reagem especificamente com os iões H^+ . Os valores de pH mais frequentes da urina recente de indivíduos saudáveis variam entre 5 e 6⁵.

Leucócitos

O teste revela a presença de esterases granulocitárias. Estas esterases decompõem um éster indoxílico em indoxil, que reage com um sal de diazónio, produzindo um corante violeta. A presença de bactérias, tricomonas ou eritrócitos na urina não afeta a reação⁵.

Nitritos

O teste é baseado no princípio da prova de Griess e é específico para nitritos. A reação revela a presença de nitritos e, indiretamente, de bactérias produtoras de nitritos na urina, através de uma coloração rosa-vermelha da zona de teste. Uma ligeira coloração rosa já indica bacteriúria significativa⁵.

Proteínas

O teste baseia-se no princípio do erro proteico de um indicador de pH. A reação é particularmente sensível à albumina. A quinina, quinidina, cloroquina, tolbutamida e um pH elevado (até pH 9) não afetam o teste⁵.

Glucose

A determinação da glucose é baseada na reação específica da glucose-oxidase/peroxidase (método GOD/POD). O teste é independente do pH e da gravidade específica da urina e não é afetado pela presença de corpos cetónicos⁵.

Corpos Cetónicos

O teste baseia-se no princípio da prova de Legal. A sensibilidade para o ácido acetoacético é superior à da acetona⁵.

Pigmentos Biliares – Urobilinogénio

Um sal de diazónio estável reage quase instantaneamente com o urobilinogénio, originando um corante azoico vermelho. O teste é específico para urobilinogénio e não está sujeito aos conhecidos fatores de interferência da prova de Ehrlich⁵.

Bilirrubina

O teste baseia-se na ligação da bilirrubina a um sal de diazónio. Uma coloração ligeiramente cor-de-rosa já constitui um resultado positivo, ou seja, patológico. Outros constituintes da urina produzem uma coloração amarela de intensidade variável⁵.

Hemoglobina

A ação, semelhante à peroxidase da hemoglobina e da mioglobina, catalisa especialmente a oxidação do indicador através do peróxido de hidrogénio orgânico contido na zona de teste, originando uma coloração azul-esverdeada⁵.

Densidade

Obtêm-se medindo os ângulos de refração da luz que passa por um prisma triangular que contém a amostra de urina. Dá-se o nome de “refractive index method”.

Obtêm-se pela seguinte fórmula: $SGx = (SGH - SGL).(Kx - KL) / (KH - KL) + SGL$ (fórmula 1)

Em que:

SGH: densidade específica da solução baixa

SGL: densidade específica da solução alta

SGx: densidade específica da amostra

KH: coeficiente de posição da solução alta

KL: coeficiente de posição da solução baixa

Kx: coeficiente de posição da amostra

O índice de reflexão da luz muda de acordo com a temperatura da amostra, então o valor da densidade específica é corrigida pela seguinte fórmula: $SGt = SGx + (TSAM - TSTD) Ct$ (fórmula 2)

Em que:

SGt: densidade específica após a compensação da temperatura

SGx: densidade específica obtida pela fórmula 1

TSAM: temperatura da amostra

TSTD: temperatura da solução low

Ct: coeficiente de temperatura (SG 0.001/3°C)

Se amostra de urina contiver uma elevada quantidade de glicose ou proteínas, isto vai interferir com a medição da densidade, então esta é depois corrigida usando o valor da concentração de glicose e de proteínas obtido pela medição das tiras-teste. Usa então a seguinte fórmula: $SG = SGt - CGLU - CPRO$

Em que:

SG: valor da densidade específica após a compensação da glucose e das proteínas

SGt: densidade específica obtida pela fórmula 2

CGLU: valor correção da glucose

CPRO: valor correção das proteínas⁵.

Turbidimetria

É medida usando luz difusa. Obtêm-se pela seguinte fórmula: $T = (SS / TS - SW / TW) / K$

Em que:

T: nível turvo

SS: luz dispersa sobre a quantidade da amostra

TS: luz transmitida sobre o nível da solução de lavagem

SW: luz dispersa sobre o nível da solução de lavagem

TW: luz transmitida sobre o nível de solução de lavagem

K: fator de coeficiente⁵.

Tom de cor da urina

São analisados simultaneamente 23 tons, medidos por diferentes comprimentos de onda (635nm; 565nm; 430nm; 760nm). Com estes comprimentos de onda obtêm-se o tom e a matiz da urina.

A matiz da urina obtêm-se pela seguinte lista: Y: reflectância a 430 nm M: reflectância a 565 nm C: reflectância a 635 nm r: reflectancia a 760 nm O tom da urina é calculado através da seguinte fórmula:

$$\sqrt{\left(1 + a - \frac{Y}{r}\right)^2 + \left(1 + a - \frac{M}{r}\right)^2 + \left(1 + a - \frac{C}{r}\right)^2}$$

a: coeficiente de correção.

O resultado é depois definido em três níveis: LIGHT, Normal ou DARK. (Claro, normal e escuro)⁵.

ANÁLISE DO SEDIMENTO URINÁRIO – MICROSCÓPIO ÓTICO

Para além da análise à urina realizada pelo Aution Max AX 4280, realizou-se também a análise do sedimento das urinas frescas, isto é, o registo da presença de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos, cristais, bactérias, células epiteliais, cilindros, entre outros. Análise essa que foi efetuada através da visualização em microscópio ótico do sedimento urinário.

No sedimento urinário podem existir:

Células

Podem ser visualizadas células de descamação ou de esfoliação espontânea, epiteliais do rim ou do trato urinário baixo e ainda células do sangue circulante (leucócitos e eritrócitos).

As células de descamação são mais abundantes na mulher, por contaminação vaginal, mas também se encontram no homem, devido a contaminação uretral. Estas células apresentam um citoplasma abundante e núcleo pequeno.

As células epiteliais são células mais pequenas de núcleo maior, que em pequeno número refletem a renovação celular normal².

Cilindros

Os cilindros são formações gelatinosas a partir de proteínas que se formam nos túbulos dos nefrónios. São compostos por mucoproteínas presentes na urina na forma solúvel, que em situações de estase urinária precipitam, tomando a forma do local onde se formam, porção distal do nefrónio e nos túbulos coletores.

Os fatores que contribuem para a sua formação são: a concentração elevada de proteínas, a presença de sais e o pH baixo.

Os cilindros podem classificar-se de acordo com a aparência da matriz (hialina, granulosa e cerosa), pelas inclusões (eritrócitos, leucócitos e células epiteliais renais) e pelos materiais embebidos na matriz (finamente divididos, grosseiramente e fibrinosos)².

Cristais

Os cristais são geralmente formados devido à ingestão insuficiente de água, uma dieta rica em proteínas ou alterações no pH da urina.

A presença de cristais na urina, principalmente de oxalato de cálcio, fosfatos/uratos amorfos entre outros não tem relevância clínica.

Os únicos cristais com relevância clínica são:

- Cristais de cistina
- Cristais de fosfato magnésiano
- Cristais de tirosina
- Cristais de bilirrubina
- Cristais de colesterol

A presença de cristais de ácido úrico, se em grande quantidade, também deve ser valorizada.

As urinas ácidas têm uma maior propensão para o aparecimento de cristais de uratos (Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+), de ácido úrico, de oxalato de cálcio, de cistina, de tirosina e de leucina (sempre patológicos).

Nas urinas alcalinas são mais frequentes os cristais de fosfatos (fosfato triplo de magnésio, amônia e CaCO_3)².

Sedimento Anormal

Um sedimento é considerado anormal quando apresenta:

- + de 5 eritrócitos ou leucócitos;
- + de 3 cilindros hialinos;
- 1 cilindro granuloso;
- + de 10 bactérias por campo;
- presença de fungos;
- presença de parasitas;
- cristais patológicos;
- grandes quantidades de cristais normais;
- grandes quantidades de muco².

OLYMPUS AU400

O OLYMPUS AU400 é um aparelho automático com leitura de código de barras que faz determinações em amostras de soro e urina. O soro utilizado obtém-se fazendo a colheita de sangue para tubos sem anticoagulante e posteriormente centrifugados. Os analisadores Olympus calculam automaticamente as concentrações de todos os



Figura 5 - OLYMPUS AU400

parâmetros que realiza, sendo que o princípio da análise depende do analito que se vai medir. Na maioria das análises dá-se uma reação, que provoca uma alteração de cor, a qual é lida fotometricamente por leitura das suas absorvâncias¹¹.

TESTES REALIZADOS

Glucose

Os hidratos de carbono fornecem glucose ao organismo. Esta é o monossacárido mais importante existente no sangue: a concentração pós-prandial é de 5 mmol de glucose por litro. O substrato de glucose é um fornecedor energético indispensável, que suporta a função celular. A degradação da glucose ocorre durante a glicólise. As determinações de glucose são utilizadas no diagnóstico e monitorização das doenças do metabolismo dos hidratos de carbono, incluindo diabetes mellitus, hipoglicemia neonatal, hipoglicemia idiopática e carcinoma das células dos ilhéus do pâncreas.

Princípio da reação: Ensaio colorimétrico enzimático

A glucose é fosforilada pela hexoquinase, na presença de ATP e iões magnésio para produzir glucose-6-fosfato e ADP. A glucose-6-fosfato desidrogenase oxida a glucose-6-fosfato para gluconato-6-fosfato, com a redução de NAD⁺ para NADH.

O aumento da absorvância a 340nm é proporcional à concentração de glucose na amostra⁵.

Ureia

A determinação de ureia constitui o teste mais amplamente utilizado para avaliação da função renal. Este teste é frequentemente usado em conjugação com a determinação de creatinina para o diagnóstico diferencial de hiperuremia pré-renal (descompensação cardíaca, desidratação, aumento do catabolismo das proteínas), hiperuremia renal (glomulonefrite, nefrite crónica, rins poliquísticos, nefrosclerose, necrose tubular) e hiperuremia pós-renal (obstrução das vias urinárias).

A ureia é o produto de degradação final do metabolismo das proteínas e aminoácidos. No catabolismo das proteínas, estas são fragmentadas em aminoácidos e desaminadas. A amónia formada neste processo é sintetizada em ureia no fígado. Esta é a via catabólica mais importante de eliminação do azoto em excesso no organismo humano.

Princípio do teste: Teste cinético Ultravioleta

A ureia é hidrolisada na presença de água e urease para produzir amónia e dióxido de carbono. O amoníaco produzido na primeira reação vai juntar-se com 2-oxoglutarato e NADH, na presença de glutamato-desidrogenase para produzir glutamato e NAD⁺. A redução da absorvância de NADH é proporcional à concentração de ureia⁵.

Creatinina

No metabolismo muscular, a creatinina é sintetizada endogenamente a partir de creatina e de fosfato de creatina. Em condições de funcionamento renal normais, a creatinina é excretada por filtração glomerular. As determinações de creatinina são executadas para fazer o diagnóstico e a monitorização das doenças renais agudas e crónicas, bem como para monitorização da hemodiálise. As concentrações de creatinina na urina podem ser utilizadas como valores de referência para a excreção de alguns analitos (albumina, α -amilase).

Princípio da reação: Ensaio colorimétrico cinético.

A creatinina forma um composto amarelo alaranjado quando se junta ácido pícrico num meio alcalino. A alteração na absorvância a 520/820nm é proporcional à concentração de creatinina na amostra⁵.

Ácido úrico

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas no organismo humano. As determinações de ácido úrico são usadas no diagnóstico e tratamento de diversas perturbações renais e metabólicas (incluindo insuficiência renal, gota, leucemia,

psoríase, subnutrição ou outras doenças que provocam fraqueza geral) e no tratamento de doentes a receber fármacos citotóxicos.

Princípio da reação: Ensaio colorimétrico enzimático

o ácido úrico é convertido, pela enzima uricase, em alantoína e peróxido de hidrogénio. O H_2O_2 formado reage com N,N-bis(4-sulfobutil)-3,5-dimetilanina, sal dissódico e 4-aminofenazona na presença de peroxidase para produzir um cromóforo que é lido bicromaticamente a 660/800 nm. A quantidade de corante formado é proporcional à quantidade de ácido úrico na amostra⁵.

Colesterol

O colesterol é um esteroide com um grupo hidroxilo secundário na posição C_3 . É sintetizado em muitos tipos de tecido, mas sobretudo no fígado e parede intestinal. Cerca de $\frac{3}{4}$ do colesterol é formado por síntese e $\frac{1}{4}$ tem origem na dieta alimentar. As determinações do colesterol são utilizadas para a despistagem do risco aterogénico e no diagnóstico e tratamento de doenças que envolvem níveis elevados de colesterol, bem como de perturbações de metabolismo lipídico e lipoproteico.

Princípio da reação: Teste colorimétrico enzimático

Os ésteres de colesterol de qualquer amostra são hidrolisados pela colesterol esterase. O colesterol livre que é produzido é oxidado pela colesterol oxidase. Na presença de fenol e de peroxidase produz-se um cromóforo. O corante vermelho de quinoneimina é medido espectrofotometricamente a 540/600 nm⁵.

HDL – Colesterol

As lipoproteínas de alta densidade (HDL – High density lipoproteins) são responsáveis pelo transporte inverso do colesterol das células periféricas para o fígado. Aqui, o colesterol é transformado em ácidos biliares que são excretados para os intestinos através das vias biliares. É clinicamente importante monitorizar o colesterol HDL no soro, pois existe uma correlação inversa entre as concentrações séricas de colesterol HDL e o risco de doenças cardiovasculares. Quando a concentração é mais elevada protege contra as cardiopatias coronárias, as concentrações reduzidas de colesterol HDL, sobretudo associadas a um nível elevado de triglicéridos, aumentam o risco cardiovascular.

Princípio da reação: Teste colorimétrico enzimático

O anticorpo antilipoproteína β -humana (reagente 1) liga-se às lipoproteínas, exceto HDL (LDL;VLDL e quilomicras). Os complexos antígeno-anticorpo formados

bloqueiam as reações enzimáticas quando é adicionado o reagente 2. O colesterol HDL é quantificado através da presença de um sistema de cromogénio enzimático⁵.

LDL-Colesterol

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL-Low Density Lipoproteins) desempenham um papel fulcral na formação e desenvolvimento da aterosclerose e, especialmente da esclerose coronária. As LDLs derivam das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLVL – Very Low Density Lipoproteins) ricas em triglicéridos através da ação de várias enzimas lipolíticas, sendo sintetizadas no fígado. A eliminação das LDL do plasma ocorre sobretudo através das células do parênquima hepático, por meio de recetores específicos das LDL. As concentrações elevadas de LDL no sangue e o aumento do seu tempo de permanência, associados a um aumento de taxa de modificação biológica, resultam na destruição da função endotelial e numa captação superior do colesterol LDL pelo sistema monócitos/macrófagos e pelas células do músculo liso nas paredes dos vasos sanguíneos. A maior parte do colesterol armazenado nas placas ateroscleróticas deriva das LDL. Entre todos os parâmetros isolados, o colesterol LDL tem um valor preditivo clínico muito importante em relação à aterosclerose coronária. Por conseguinte, as terapêuticas que visam a redução lipídica têm como principal alvo a redução do colesterol LDL, que resulta num melhoramento da função endotelial e na prevenção da aterosclerose, reduzindo a sua progressão e evitando a rutura das placas.

Princípio da reação: Ensaio colorimétrico enzimático

Todas as lipoproteínas não LDL, são decompostas através da reação da colesterol esterase e colesterol oxidase. O peróxido de hidrogénio produzido é decomposto pela enzima catalase. O LDL pode então ser quantificado quando se adiciona um reagente que vai inativar a enzima catalase⁵.

Triglicéridos

Os triglicéridos são ésteres do glicerol-álcool tri-hidratado com 3 ácidos gordos de cadeia longa. São parcialmente sintetizados no fígado e parcialmente ingeridos com os alimentos.

A determinação dos triglicéridos é utilizada no diagnóstico e tratamento de doentes com diabetes mellitus, nefrose, obstrução hepática, alterações do metabolismo dos lípidos e inúmeras outras doenças endócrinas.

Princípio da reação: Teste colorimétrico enzimático

Este teste baseia-se numa série de reações enzimáticas conjuntas. Os triglicéridos são hidrolisados para produzir glicerol e ácidos gordos. O glicerol é hidrolisado através de ATP na presença de glicerol quinase para produzir glicerol-3-fosfato. Este, por sua vez, é oxidado para produzir H_2O_2 e dihidroxiacetona fosfato. O peróxido de hidrogénio reage na presença de peroxidase para produzir um cromóforo que é lido a 660/800 nm. O aumento da absorção é proporcional ao conteúdo de triglicéridos na amostra⁵.

Aspartato-aminotransferase (AST)

A aspartato-aminotransferase (glutamato-oxaloacetato-transaminase) pertence ao grupo das transaminases que catalisam a conversão dos aminoácidos para os correspondentes α -cetoácidos por transferência de grupos amina; eles também catalisam o processo reverso. A aspartato-amino-transferase encontra-se amplamente distribuída pelos tecidos humanos. Embora as concentrações mais elevadas se registem no músculo cardíaco, é também possível detetar uma atividade significativa no cérebro, fígado, mucosas gástricas, tecido adiposo, musculatura esquelética e rins. A AST está presente tanto no citoplasma como nas mitocôndrias das células. Em casos que envolvem lesões tissulares ligeiras, a forma predominante de AST é a libertada pelo citoplasma, com uma menor quantidade libertada pelas mitocôndrias. Nos casos de lesões mais graves, observa-se libertação de uma maior quantidade da enzima da mitocôndria. Níveis elevados de transaminases podem indicar enfarte do miocárdio, hepatopatia, distrofia muscular e lesões orgânicas.

Princípio da reação: Teste Ultravioleta cinético

A aspartato aminotransferase catalisa a transaminação de aspartato e 2-oxoglutarato, formando-se L-glutamato e oxolacetato. A adição de fosfato piridoxal à mistura da reação garante a atividade catalítica máxima da AST. O oxalacetato é reduzido em L-malato pela enzima malato desidrogenase, enquanto o NADH é convertido em NAD^+ . A redução na absorvância devida ao consumo de NADH é medida a 340 nm e é proporcional à atividade de AST na amostra⁵.

Alanina-aminotransferase (ALT)

A alanina-aminotransferase (glutamato-piruvato-transaminase) pertence ao grupo das transaminases que catalisam a interconversão dos aminoácidos e dos α -cetoácidos por transferência de grupos amina. Embora a maior parte da atividade se verifique no fígado, é também possível detetar uma atividade significativa nos rins, coração, musculatura esquelética, pâncreas, baço e tecido pulmonar. Níveis elevados de transaminases podem indicar enfarte do miocárdio, hepatopatia, distrofia muscular e

lesões orgânicas. Só muito raramente é que se observam aumentos séricos das atividades da ALT, salvo no caso da doença do parênquima hepático, dado que a ALT é uma enzima mais específico do fígado do que o AST.

Princípio da reação: Teste Ultravioleta cinético

O ALT transfere o grupo amino da alanina para o 2-oxoglutarato para formar piruvato e glutamato. O piruvato participa na reação catalisada pelo LDH com o NADH para produzir lactato e NAD⁺. A redução da absorvância devido ao consumo de NADH é medida a 340 nm e é proporcional à atividade de ALT na amostra⁵.

Gama-Glutamiltransferase (GGT)

A gama-glutamiltransferase é utilizada no diagnóstico e monitorização das doenças hepatobiliares. A atividade enzimática da GGT é, muitas vezes, o único parâmetro onde se observa um aumento dos valores quando se analisam essas doenças e é um dos indicadores mais sensíveis conhecidos.

A gama-glutamiltransferase é também um teste de despistagem sensível para alcoolismo oculto. Observou-se um aumento da atividade de GGT no soro dos doentes que necessitam de medicação a longo prazo com fenobarbital e fenitoína.

Princípio da reação: Ensaio colorimétrico enzimático

A alteração na absorvância a 410/480 nm deve-se à formação de 5-amino2-benzoato e é diretamente proporcional à atividade de GGT na amostra⁵.

Fosfatase alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina no soro consiste em quatro genótipos estruturais: o tipo fígado-osso-rim, o tipo intestinal, o tipo placentário e a variante de células germinais. Ocorre nos osteoblastos, hepatócitos, leucócitos, rins, baço, placenta, próstata e intestino delgado. O tipo fígado-osso-rim é particularmente importante.

Ocorre um aumento da atividade da fosfatase alcalina em todas as formas de colestase, particularmente na icterícia obstrutiva. Também se encontra elevada em doenças do sistema esquelético, como a doença de Paget, hiperparatiroidismo, raquitismo e osteomalacia, assim como nas fraturas e nos tumores malignos. Por vezes, observa-se um aumento considerável na atividade da fosfatase alcalina em crianças e jovens. É provocada pelo aumento da atividade dos osteoblastos a seguir a crescimento ósseo acelerado.

Princípio da reação: Ensaio colorimétrico

A atividade da ALP é determinada através da medição da taxa de conversão p-nitrofenilfosfato em p-nitroferol na presença de iões magnésio, de zinco e de 2-amino-2-

metil1-propranol como aceitador de fosfato a pH 10,4. A absorvância é medida a 410/480 nm e é diretamente proporcional à atividade de ALP na amostra⁵.

Bilirrubina total

A bilirrubina é um composto orgânico formado pelo sistema reticuloendotelial durante a destruição normal e anormal dos glóbulos vermelhos. As determinações da bilirrubina são utilizadas no diagnóstico das doenças hepáticas, na deteção da anemia hemolítica e para avaliar os diferentes graus de icterícia.

Princípio da reação: Ensaio Fotométrico e colorimétrico

Um sal diazóico estabilizado reage com a bilirrubina conjugada e com a bilirrubina não conjugada para formar azobilirrubina. A absorvância a 540 nm deste composto é proporcional à concentração de bilirrubina total⁵.

Bilirrubina Direta

A bilirrubina é produzida durante a degradação normal e anormal dos eritrócitos no sistema reticuloendotelial. As determinações de bilirrubina são utilizadas no diagnóstico de doenças hepáticas, na deteção da anemia hemolítica e na avaliação do grau de gravidade da icterícia.

Princípio da reação: Ensaio Fotométrico e colorimétrico

Um sal diazóico estabilizado (DPD) liga-se diretamente à bilirrubina direta (conjugada) num meio ácido para formar azobilirrubina. A absorvância é lida 570 nm e é proporcional à concentração de bilirrubina direta na amostra⁵.

Proteínas totais

As proteínas plasmáticas são sintetizadas sobretudo no fígado, células plasmáticas, gânglios linfáticos, baço e medula óssea. No decorrer da doença, tanto a concentração de proteínas totais como a percentagem representada por frações individuais pode apresentar desvios significativos dos valores normais.

A hipoproteïnemia pode ser causada por doenças e perturbações como perda de sangue, caquexia aftosa, síndrome nefrótico, queimaduras graves, síndrome de retenção de sal e Kwashiorkor (deficiência proteica aguda).

Pode observar-se hiperproteïnemia em casos de desidratação grave e doenças como o mieloma múltiplo. As alterações da percentagem relativa de proteínas plasmáticas podem ser provocadas por uma modificação da percentagem de uma fração proteica plasmática. Muitas vezes, nestes casos, a quantidade de proteínas totais não sofre quaisquer tipos de alteração.



A razão A/G é vulgarmente utilizado como índice de distribuição das frações de albumina e globulina. Podem observar-se alterações marcadas desta razão no caso de cirrose hepática, glomerulonefrite, síndrome nefrótico, hepatite aguda, lúpus eritematoso e ainda em determinadas inflamações agudas e crónicas. As determinações das proteínas totais são utilizadas no diagnóstico e tratamento de uma série de doenças que envolvem o fígado, os rins ou a medula óssea, bem como outras perturbações metabólicas ou nutricionais.

Princípio da reação: Ensaio fotométrico

Íons de uma solução alcalina, reagem com as proteínas e polipeptídeos para produzir um complexo de cor violeta. A absorvância a 540/660 nm é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra⁵.

Ferro Sérico

A concentração de ferro no corpo humano é, normalmente, cerca de 40-50mg Fe/Kg; as mulheres, tipicamente, têm menor quantidade de ferro do que os homens. A maioria do ferro está contida em compostos necessários para a atividade metabólica normal.

O compartimento de ferro funcional inclui cerca de 30 mg Fe/Kg como ferro hemoglobínico contido nos glóbulos vermelhos circulantes e uma quantidade adicional de 6-7mg Fe/Kg presente em muitos tecidos, na mioglobina, numa variedade de enzimas hémicos (citocromos, catalases, peroxidases) e em enzimas não hémicos (ribonucleotídeo redutase, metaloflavoproteínas, etc.). O ferro de transporte consiste numa pequena fração (<0,5%) do ferro corporal total, em trânsito para satisfazer as necessidades dos tecidos. Está ligado à transferrina no plasma e nos líquidos extracelulares. O ferro restante (5-6mg Fe/Kg nas mulheres, 10-12 mg Fe/Kg nos homens) é o ferro de armazenamento, na forma de ferritina e hemossiderina, principalmente nos hepatócitos e nos macrófagos do fígado, medula óssea, baço e músculo, disponível como uma reserva prontamente disponível no caso de perdas sanguíneas.

O ferro plasmático e a saturação da transferrina (razão entre o ferro plasmático e a capacidade total de fixação do ferro), constituem uma medida do fornecimento de ferro aos tecidos. Após o ferro dos depósitos se esgotar, o ferro sérico diminui; uma saturação da transferrina <16% é frequentemente um critério de eritropoiese deficiente em ferro. Em contraste, o ferro plasmático e a saturação da transferrina não estão sempre elevados, como na fase inicial da sobrecarga transfusional em ferro, quando o ferro dos depósitos está elevado dentro dos macrófagos, embora a saturação da

transferrina possa aumentar com a sobrecarga parenquimatosa em ferro. A interpretação da saturação da transferrina é complicada pelas flutuações substanciais circadianas de ferro plasmático, assim como pelas variações dia a dia > 30%. Para além disso, o ferro plasmático diminui na infeção, inflamação, neoplasias malignas e deficiência de ascorbato, mas aumenta na ingestão oral de ferro, nas anemias aplásica e sideroblástica, eritropoiese ineficaz e doença hepática.

Princípio da reação: Ensaio fotométrico

Num meio ácido, o ferro ligado à transferrina decompõe-se em iões de ferro livres e apotransferrina. O ácido hidroclicórico e o ascorbato de sódio convertem os iões de ferro no estado ferroso. Os iões ferrosos reagem depois com o TPTZ [2,4,6-Tri-(2-pyridyl)-5-triazina] para formar um complexo de cor azul que pode ser medido bicromaticamente a 600/800 nm. O aumento da absorvância é diretamente proporcional à quantidade de ferro ligado à transferrina registada⁵.

CK

A creatina-quinase (CK) é uma enzima dimérica que existe em quatro formas diferentes: uma isoenzima mitocondrial e as isoenzimas citosólicas CK-MM (tipo músculo esquelético), CK-BB (tipo cérebro) e CK-MB (tipo miocárdio).

A determinação da atividade da CK e respetivas isoenzimas é um elemento importante no diagnóstico e monitorização do enfarte do miocárdio e miopatias, tais como, a distrofia muscular progressiva de Duchenne.

Após lesão do miocárdio, à semelhança do que acontece com o enfarte agudo do miocárdio, a CK é libertada pelas células lesadas. Em casos recentes pode-se encontrar uma atividade de CK aumentada cerca de 4 horas após o enfarte. A atividade de CK atinge o seu máximo após 12 a 24 horas, voltando ao valor normal ao fim de 3 a 4 dias.

Princípio da reação: Teste ultravioleta/cinético

A CK catalisa reversivelmente a transferência de um grupo de fosfatos do fosfato de creatinina para ADP, para formar creatinina e ATP como produtos. Com a intervenção de outras reações em que participam as enzimas HK, G6P-DH, vai haver formação de NADPH e 6-fosfoglutonato. O aumento da absorvância a 340/660 nm, devido à formação de NADPH é diretamente proporcional à atividade de CK na amostra⁵.

Lactato Desidrogenase (LDH)

As delimitações da LDH são realizadas para o diagnóstico e tratamento de hepatopatias como hepatite viral aguda, cirrose e carcinoma metastático do fígado, cardiopatias como enfarte do miocárdio e tumores renais e pulmonares.

Princípio da reação: Teste UV/Cinético

O LDH catalisa a oxidação do lactato a piruvato juntamente com a redução de NAD⁺ a NADH. O aumento de NADH é medido a 340 nm e é diretamente proporcional à atividade enzimática na amostra⁵.

Amilase

Estas enzimas, capazes de cindir as ligações 1-4 do amido, são produzidas pelo pâncreas e pelas glândulas salivares. Passam para o soro de cada vez que uma obstrução dos canais ou uma necrose celular aumenta a sua concentração no espaço intersticial periglandular.

A amilase sérica é eliminada no soro em algumas horas, principalmente por via urinária.

Princípio da reação: Ensaio Fotométrico

O substrato CNPG₃ reage diretamente com a alfa-amilase e liberta 2-cloro4-nitrofenil. O resultante da absorvância a 410 nm é diretamente proporcional à atividade de alfa-amilase da amostra⁵.

Transferrina

A transferrina medeia a troca de ferro entre os tecidos corporais. Uma vez absorvido o ferro liga-se à transferrina plasmática. Cerca de 80% do ferro em trânsito (cerca de 24mg Fe/dia) é captado pelos precursores eritroides na medula óssea; a maioria deste (17mg Fe/dia) torna-se ferro hemoglobínico nos glóbulos vermelhos circulantes. Os restantes 20% do ferro transportado pela transferrina incluem: a troca de ferro com os hepatocitos (5mg Fe/dia), o movimento entre os compartimentos plasmático e extravasculares da transferrina (cerca de 3mg Fe/dia), a troca entre a transferrina extravascular e os tecidos parenquimatosos (cerca de 2mg Fe/dia) e a troca externa limitada de ferro através das perdas obrigatórias e absorção de ferro do tubo digestivo (cerca de 1e 1,5mg Fe/dia, para os homens e mulheres, respetivamente).

É um indicador das reservas corporais de ferro muito menos sensível do que a ferritina plasmática. É, geralmente, medida nos laboratórios clínicos como capacidade total de fixação do ferro. A transferrina pode aumentar com a depleção do ferro das reservas e diminuir com a sobrecarga em ferro, mas não é um índice consistente de confiança

porque os seus níveis são alterados por outros fatores. A inflamação, a infeção, as neoplasias malignas, a doença hepática, o síndrome nefrótico e a má-nutrição também deprimem os níveis de transferrina, enquanto a gravidez e os contraceptivos orais aumentam os seus níveis.

Princípio da reação: Ensaio Imuno-turbidimétrico

A transferrina humana reage especificamente com anticorpos transferrina anti-humanos para produzir agregados insolúveis. A absorção destes agregados é proporcional à concentração de transferrina na amostra⁵.

Ferritina

A ferritina é uma proteína major de armazenamento, composta de 24 subunidades. Existe em, praticamente, todas as células. Constitui uma reserva acessível de ferro para a síntese dos compostos funcionais contendo ferro e é um meio de sequestrar o ferro numa forma solúvel, aparentemente não tóxica. É especialmente abundante nas células com papel especializado na síntese de compostos contendo ferro (precursores eritroides) e no metabolismo e armazenamento do ferro (macrófagos e hepatocitos).

O seu catabolismo pode resultar na digestão do invólucro proteico com reutilização do ferro do core ou em conversão para hemossiderina, um composto amorfo de armazenamento, insolúvel em água, com maior conteúdo em ferro e menor turnover do que a ferritina.

Concentrações diminuídas de ferritina plasmática têm grande valor na deteção da deficiência em ferro. As concentrações de ferritina plasmática diminuem com a depleção dos depósitos de ferro. As únicas situações conhecidas que podem diminuir as concentrações de ferritina plasmática, independentemente de uma diminuição dos depósitos de ferro, são o hipotiroidismo e a deficiência de ascorbato. Concentrações aumentadas de ferritina plasmática podem indicar aumento dos depósitos de ferro, mas o aumento da ferritina plasmática pode ser devido a uma variedade de situações, independentemente do ferro corporal. A ferritina plasmática é uma proteína de fase aguda, sendo o aumento da sua síntese uma resposta inespecífica, parte dos efeitos sistémicos da inflamação. O seu aumento pode ser devido a: febre, infeções agudas, artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias crónicas. As lesões agudas e crónicas do fígado, assim como de outros tecidos ricos em ferritina, pode aumentar a ferritina plasmática como um processo inflamatório ou por libertação das ferritinas tissulares das células parenquimatosas lesadas.

Princípio da reação: Ensaio Imuno-turbidimétrico

É medida a diminuição da intensidade da luz transmitida (aumento da absorção) através de partículas suspensas na solução como resultado de complexos formados durante a reação antigénio-anticorpo⁵.

Magnésio

O magnésio e o potássio são importantes catiões intracelulares. O Mg^+ é um co-fator de muitos sistemas enzimáticos. Consequentemente, todas as reações enzimáticas dependentes de ATP requerem Mg^{2+} como co-fator do complexo ATP-magnésio. Aproximadamente 69% dos iões magnésio estão armazenadas nos ossos. Os restantes fazem parte do metabolismo intermediário, estando cerca de 70% presentes na forma livre, ao passo que os outros 30% se encontram ligados a proteínas (especialmente à albumina), aos citratos, ao fosfato e a outros formadores de complexo. O nível sérico de Mg^{2+} é mantido constante dentro de limites muito estreitos (0,65-1,05 mmol/l). A regulação tem lugar principalmente por via renal, especialmente através da porção ascendente da ansa de Henle.

Este ensaio é utilizado para diagnosticar e monitorizar a hipomagnesemia (deficiência de magnésio) e hipermagnesemia (excesso de magnésio).

Numerosos estudos demonstraram uma correlação entre a deficiência de magnésio e as alterações da hemostase do cálcio, potássio e fosfato que estão associadas a perturbações cardíacas, como é o caso das arritmias ventriculares que não podem ser tratadas através de terapêuticas convencionais, da sensibilidade aumentada à digoxina, dos espasmos da artéria coronária e da morte súbita. Entre outros sintomas concomitantes incluem-se as perturbações neuromusculares e neuropsiquiátricas. A hipermagnesemia é observada na insuficiência renal aguda e crónica, nos casos de excesso de magnésio e na libertação de magnésio no espaço intracelular.

Princípio da reação: Método Fotométrico

Método direto no qual os iões magnésio formam um complexo colorido com azul de xilidil numa solução fortemente básica. A cor é medida a 520/800 nm e é proporcional à concentração de magnésio na amostra⁵.

Cálcio

O teor de cálcio num adulto corresponde ligeiramente a mais de 1 kg (25000 mmol), ou seja, cerca de 2% do peso corporal. Deste, 99% está presente sob a forma de hidroxapatite de cálcio nos ossos e menos de 1% está presente no ECS (espaço extracelular) ou ICS (espaço intracelular) extraósseo. O nível de cálcio no soro no ECS (aprox. 100 mmol) está em equilíbrio dinâmico com a fração rapidamente permutável

de cálcio ósseo. Os íons de cálcio afetam a capacidade de contração do coração e da musculatura esquelética e são essenciais para o funcionamento do sistema nervoso. Além disso, os íons de cálcio desempenham um papel importante na coagulação sanguínea e na mineralização óssea. No plasma, o cálcio está ligado numa grande proporção às proteínas (cerca de 40%), estando 10% presente sob a forma de complexos inorgânicos e 50% como cálcio livre (ionizado). O equilíbrio do cálcio no organismo é regulado pela hormona da paratiroide (PTH), calcitriol (CT) e calcitonina. O teste é usado para o diagnóstico e monitorização da hipocalcemia (deficiência de cálcio) e hipercalcemia (excesso de cálcio) no soro. O sintoma característico da hipocalcemia é o tétano latente ou manifesto e osteomalacia.

A hipocalcemia é causada pela ausência ou deficiência do funcionamento da paratiroide ou deficiência da síntese da vitamina D. A hipercalcemia é provocada por um aumento da mobilização de cálcio no sistema esquelético (osteoporose) ou por um aumento da absorção intestinal. A maior parte dos casos são causados pelo hiperparatiroidismo primário (pHPT) ou metástases ósseas do carcinoma da mama, próstata ou tiroide e carcinoma brônquico.

A grande importância da determinação do cálcio na urina reside na diferenciação entre hipercalcúria e hipocalcúria e no esclarecimento de nefrolitíase.

Princípio da reação: Teste Fotométrico

Baseia-se na reação de íons cálcio com Arsenazo III para formar um complexo de cor roxa intensa. A absorvância do complexo é medida a 660/700 nm. O aumento da absorvância da mistura é diretamente proporcional à concentração de cálcio da amostra⁵.

Fósforo

88% da quantidade de fósforo existente no organismo situa-se no osso, sob a forma de fosfato de cálcio, como a apatite $\text{Ca}^{2+} [\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3^{2-}$. A restante quantidade está envolvida no metabolismo intermédio dos hidratos de carbono e em substâncias fisiologicamente importantes como fosfolípidos, ácidos nucleicos e ATP. O fósforo encontra-se no sangue sob a forma de fosfato inorgânico e de ácido fosfórico organicamente ligado. A fraca quantidade de fósforo orgânico extracelular encontra-se quase exclusivamente sob a forma de fosfolípidos. A razão fosfato/cálcio no sangue é de cerca de 6:10. Um aumento do nível de fósforo provoca uma redução do nível de cálcio. O mecanismo é influenciado por interações entre a paratormona e a vitamina D.

O hipoparatiroidismo, a intoxicação por vitamina D e a insuficiência renal associada a uma redução da taxa de filtração glomerular do fosfato provocam hiperfosfatemia. A hipofosfatemia ocorre no raquitismo, no hiperparatiroidismo e no síndrome de Fanconi.

Princípio da reação: Ensaio UV Fotométrico

O fósforo inorgânico reage com molibdato para formar um complexo heteropoliácido. A absorvância é lida a 340/380 nm e é diretamente proporcional à concentração de fósforo inorgânico na amostra⁵.

Albumina

A albumina é uma proteína sem hidratos de carbono, que constitui 55-65% das proteínas plasmáticas totais. Liga-se e solubiliza diversos compostos como, p. ex., bilirrubina, cálcio e ácidos gordos de cadeia longa. Além disso, a albumina é capaz de ligar os iões tóxicos de metais pesados bem como um grande número de produtos farmacêuticos. Por este motivo é que as concentrações de albumina mais baixas no sangue têm um efeito significativo sobre a farmacocinética.

A hiperalbuminemia tem pouco significado em termos de diagnóstico, salvo em caso de desidratação. A hipoalbuminemia ocorre em muitas doenças, sendo causada por diversos fatores: síntese debilitada quer em resultado de uma doença hepática, quer devido a uma diminuição da ingestão de proteínas; aumento do catabolismo devido a lesões tissulares (queimaduras graves) ou inflamação; má absorção de aminoácidos (doença de Crohn); proteinúria em consequência de síndrome nefrótica; perda de proteínas através das fezes (doença neoplásica). Nos casos graves de hipoalbuminemia, a concentração máxima de albumina no plasma é de 2,5 g/dl. Devido à reduzida pressão osmótica do sangue, a água atravessa os capilares sanguíneos e penetra no tecido (edema). A determinação da albumina permite a monitorização da suplementação dietética num doente controlado e funciona também como um teste excelente de função hepática.

Princípio da reação: Ensaio Fotométrico

A albumina vai reagir com verde de bromocresol para formar um complexo corado, a absorvância deste complexo é medida a 600/800 nm e é proporcional à concentração de albumina⁵.

Imunoglobulina A (IgA)

A Imunoglobulina A (IgA) é um anticorpo. Representa 15-20% das imunoglobulinas do soro humano. No homem, mais de 80% da IgA ocorre sob a forma monomérica e está presente no sangue nesta forma.

A IgA é a imunoglobulina predominante em secreções: saliva, lágrima, leite, mucosas do trato gastrointestinal, trato respiratório e genitourinário. Nestas secreções ela une-se a um componente secretor (70.000 daltons), formando a IgA secretora. Esta é composta por 2 unidades (dimérica) ligadas a uma cadeia J unida na sua porção FC no componente secretor. A função desse componente é proteger a molécula das enzimas hidrolíticas (destrutivas).

As principais funções da IgA reside na ativação das reações inflamatórias, desempenha um papel importante na proteção do trato respiratório, genitourinário e gastrointestinal contra infeções. Indivíduos com défice de IgA secretória têm tendência para sofrer com mais frequência de infeções das mucosas e doenças autoimunes. Indivíduos com ausência de IgA sofrem de problemas reumáticos e linfomas com uma incidência superior.

Princípio da reação: Ensaio Imuno-Turbidimétrico

A IgA humana vai reagir especificamente com uma solução antissoro com anticorpos anti-IgA para produzir agregados insolúveis. A absorvância é proporcional à concentração de IgA na amostra⁵.

Imunoglobulina G (IgG)

A Imunoglobulina G (IgG) é um anticorpo. É uma imunoglobulina monomérica simples de 150.000 daltons, cadeias pesadas tipo G, que perfaz 80% das imunoglobulinas do organismo. Esta imunoglobulina é particularmente importante na defesa a longo prazo do organismo contra infeções, já que apresenta uma resposta mais lenta e mais sustentada que a IgM a um estímulo antigénico primário. Contudo os níveis aumentam rapidamente e cedo quando o organismo é exposto novamente ao mesmo estímulo antigénico. É a única imunoglobulina que passa a placenta e por isso é importante na defesa das crianças contra as infeções.

Princípio da reação: Ensaio Imuno-Turbidimétrico

A IgG humana vai reagir especificamente com uma solução antissoro com anticorpos anti-IgG para produzir agregados insolúveis. A absorvância é proporcional à concentração de IgG na amostra⁵.

Imunoglobulina M (IgM)

Esta Imunoglobulina perfaz aproximadamente 10% do conjunto de imunoglobulinas. Apresenta uma estrutura pentamérica, sendo que as cadeias pesadas individuais têm um peso molecular de aprox. 65.000 daltons e a molécula completa tem um peso de 970.000! As 5 cadeias são ligadas entre si por pontes dissulfeto e por uma cadeia

polipeptídica inferior chamada de cadeia J. A IgM é encontrada principalmente intravascularmente, sendo uma classe de anticorpos "precoces" (são produzidas agudamente nas fases agudas iniciais das doenças que desencadeiam resposta humoral). É uma proteína que não atravessa a placenta (por ser grande) e inclui os anticorpos naturais, por exemplo, grupo sanguíneo AB0, Rh e anticorpos para IgG, por exemplo, fatores reumatóides. A função essencial da IgM na resposta imunitária é a aglutinação de elementos considerados patogénicos e a ativação da via complementar clássica.

Princípio da reação: Ensaio Imuno-Turbidimétrico

A IgM humana vai reagir especificamente com uma solução antissoros com anticorpos anti-IgM para produzir agregados insolúveis. A absorvância é proporcional à concentração de IgM na amostra⁵.

 **PCR**

A proteína C reativa é a proteína clássica da fase aguda das reações inflamatórias. É sintetizada pelo fígado e é constituída por cinco cadeias polipeptídicas idênticas que formam um anel com cinco membros, com um peso molecular de 120000 daltons. A PCR é o mais sensível dos reagentes da fase aguda e as suas concentrações aumentam rapidamente durante os processos inflamatórios. A PCR complexada ativa o sistema de complemento, com início em C1p. Depois, a PCR inicia a opsonização e a fagocitose das células invasoras, mas a sua função principal é ligar e desintoxicar substâncias tóxicas endógenas produzidas em resultado de lesões tecidulares.

Os ensaios da PCR são utilizados para detetar processos inflamatórios sistémicos (além de alguns tipos de inflamação, como a SLE e a colite ulcerosa); avaliar o tratamento de infeções bacterianas com antibióticos; detetar infeções intrauterinas com amniurese prematura concomitante; diferenciar entre as formas ativa e inativa de doenças com infeções concomitantes, por exemplo, em doentes com SLE ou colite ulcerosa; monitorizar terapêuticamente doenças reumáticas e avaliar a terapêutica anti-inflamatória; determinar a presença de complicações pós-operatórias numa fase inicial, por exemplo, no caso de feridas infetadas, trombose ou pneumonia, e distinguir entre infeção e rejeição do transplante de medula óssea.

Princípio da reação: Ensaio Imuno-turbidimétrico

A PCR reage especificamente com anticorpos anti-PCR para produzir agregados insolúveis. A absorvância é proporcional à concentração de PCR na amostra⁵.

Fator Reumatoide (RF)

Os RF são anticorpos dirigidos contra determinantes antigénicos no fragmento Fc da IgG. Geralmente são anticorpos IgG. É utilizado para o diagnóstico da artrite reumatoide.

Princípio da reação: Ensaio Imuno-turbidimétrico

O RF reage especificamente com a IgG em partículas de latex para produzir agregados insolúveis. A absorvância é proporcional à concentração de RF na amostra⁵.

Antiestreptolisina O (TASO)

A estreptolisina O é uma hemolisina produzida pelos Streptococcus do grupo A. Este streptococcus do grupo A é responsável por infeções bacterianas que provocam doenças como febre reumática aguda, pneumonia, faringite aguda, entre outras.

Princípio da reação: Ensaio Imuno-turbidimétrico

Os anticorpos antiestreptolisina O reagem especificamente com latex revestido com estreptolisina O para produzir agregados insolúveis. A absorvância é proporcional à concentração de ASO na amostra⁵.

Apolipoproteína A1

As apolipoproteínas são os constituintes proteicos das lipoproteínas.

Estas classificam-se conforme a sua densidade de flutuação ultracentrífuga. A apolipoproteína A1 é o principal constituinte proteico das lipoproteínas de alta densidade (high-density lipoproteins – HDL).

A apolipoproteína A1 ativa a enzima lecitina-colesterol-aciltransferase (LCAT), que catalisa a esterificação do colesterol, aumentando a capacidade de transporte lipídico das lipoproteínas. Os níveis de apolipoproteína A1 aumentam durante a gravidez, doença hepática e após a administração de estrogénios (p.ex., contraceptivos orais). Os níveis de apolipoproteína A1 diminuem na hipo- α -lipoproteinemia (p.ex, doença de Tangier), colestase, sépsis e aterosclerose.

Princípio da reação: Ensaio imunoturbidimétrico

A APO A1 reage especificamente com anticorpos anti-APO A1 para produzir agregados insolúveis. A absorvância é proporcional à concentração de APO A1 na amostra⁵.

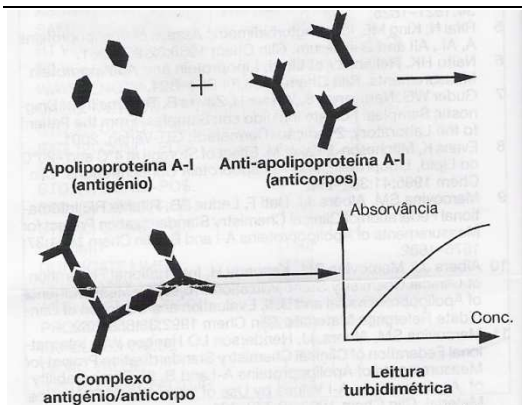


Figura 6 – Ensaio Imunoturbidimétrico

Apolipoproteína B

O fígado sintetiza lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), as quais contêm principalmente triglicéridos e colesterol. Na presença de lipoproteína lipase, os triglicéridos são hidrolisados, formando-se partículas LDL com uma grande proporção de colesterol. A apolipoproteína B é o principal constituinte das LDL. Cerca de um terço das partículas LDL fornecem colesterol às células periféricas. Os outros dois terços são metabolizados pelo fígado. A captação de LDL em todos estes tecidos ocorre através dos recetores LDL. Os níveis de apolipoproteína B aumentam na gravidez, hipercolesterolemia, defeitos dos recetores LDL, obstruções biliares, hiperlipidémia de tipo II e síndrome nefrótica. Os níveis de apolipoproteína B diminuem durante a doença hepática, α - β lipoproteinemia, sépsis e administração de estrogénios.

A determinação conjunta da apolipoproteína A1/apolipoproteína B, assim como o cálculo da razão apolipoproteína B: apolipoproteína A1, podem refletir um distúrbio do metabolismo lipídico e o risco de contrair aterosclerose ou doença coronária, proporcionando deste modo uma excelente mais valia na determinação clássica do colesterol HDL/LDL. Um nível elevado de apolipoproteína A-1 (HDL) associado a um nível baixo de apolipoproteína B (LDL), correlacionam-se melhor com um risco baixo para estas doenças.

Princípio da reação: Ensaio imunoturbidimétrico

A APO B reage especificamente com anticorpos anti-B para produzir agregados insolúveis. A absorvância é proporcional à concentração de B na amostra⁵.

Ionograma (sódio, potássio, e cloro)

Os eletrólitos afetam a maioria dos processos metabólicos. Servem para manter a pressão osmótica e a hidratação de vários fluidos corporais. Regulam as funções

cardíaca e muscular e mantém o pH do organismo. Também se encontram como co-fatores nas reações enzimáticas.

Princípio da reação: Módulo ISE

O módulo ISE integra elétrodos de membrana éter-coroa para sódio e potássio e uma membrana de PVC para o cloro. É desenvolvido um potencial elétrico de acordo com a equação de Nernst para um íon específico. O potencial elétrico é convertido em voltagem e seguidamente nas concentrações de íões da amostra⁵.

Proteínas na Urina

As determinações das proteínas na urina são usadas no diagnóstico e tratamento de doenças, como as doenças renais ou cardíacas, ou perturbações da tiroide, que se caracterizam pela presença de proteinúria ou albuminúria.

A urina é formada por ultra filtração do plasma através da parede capilar glomerular. As proteínas com uma massa molecular relativa > que 40.000 dalton são praticamente todas retidas, ao passo que quantidades mais pequenas passam facilmente na filtração glomerular.

Princípio da reação: Ensaio Fotométrico

Através da formação de um complexo vermelho com uma absorvância máxima a 470 nm. A determinação é baseada na mudança da absorvância. Um complexo azul púrpura é formado a 600nm. A absorvância deste complexo é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra⁵.

Microalbuminúria

Uma evidência clínica da existência de nefropatia é o aparecimento de níveis baixos e anormais de albumina na urina (20 µg/min ou ≥30 mg/dia). É um indicador importante para a monitorização da função renal em pessoas diabéticas (tipo I e II).

Princípio da reação: Ensaio imunoturbidimétrico

A albumina reage especificamente com anticorpos antialbumina para produzir agregados insolúveis. A absorvância destes agregados é proporcional à concentração de albumina na amostra⁵.

Racio Proteinúria/Creatinúria

Esta determinação é utilizada em alguns casos em que a colheita de urina de 24 horas é difícil de ser realizada, usando-se uma amostra aleatória de urina e procedendo-se à determinação individual da proteinúria e da creatinúria nessa mesma amostra.



A concentração de proteínas na urina vem nas unidades de gramas/Litro, enquanto a creatinina vem em miligramas/decilitro. Então o primeiro passo é passar a concentração das proteínas para mg/dL, as mesmas unidades da creatinina. De seguida é dividir o valor da concentração das proteínas totais pelo valor da concentração de creatinina. O valor final do rácio é dado em mg/dL.

IMUNOLOGIA

EQUIPAMENTOS ANALÍTICOS - MÉTODOS E TÉCNICAS UTILIZADOS

ADVIA CENTAUR

O ADVIA CENTAUR é um aparelho automático com leitura de código de barras que faz determinações em amostras de soro. O soro utilizado obtém-se fazendo a colheita de sangue para tubos sem anticoagulante e posteriormente centrifugados. Este analisador calcula automaticamente as concentrações de todos os parâmetros que realiza.



Figura 7 - ADVIA CENTAUR

A tecnologia utilizada por este equipamento é a quimioluminescência em combinação com a tecnologia de imunoensaio, sendo que a luz produzida pela reação indica a quantidade de analito da amostra¹¹.

A **quimiluminescência** é uma reação química que emite energia sobre a forma de luz utilizando para isso como marcador o Éster Acridínio (marcador direto – não necessita da adição de um catalisador ou substrato para se oxidar, não necessita de uma incubação adicional para amplificar o sinal e efetua uma emissão rápida e intensa de luz).

A Éster Acridínio (EA) é oxidada pelo peróxido de hidrogénio e a luz emitida é maximizada pela alteração de meio ácido para meio básico. Este marcador pode unir-se covalentemente aos anticorpos permitindo por isso a utilização complementar das duas tecnologias.

Utilizam-se também partículas paramagnéticas – PMP - (cristais de óxido de ferro que são atraídos por um campo magnético), estas partículas unem-se covalentemente tanto a antigénios como a anticorpos na fase sólida, proporcionando uma superfície de reação muito maior – 50x mais do que os tubos revestidos. São utilizadas para separar o material ligado do não ligado.

Imunoensaios utilizados: Reação Sandwich, Reação de Competição – antigénio ou anticorpo marcado e Captura de Anticorpo.

Reação Sandwich

- 1 - Anticorpos ligados a éster de acridínio adicionam-se à amostra, unindo-se ao analito (antigénio) que queremos medir;
- 2 - Adicionam-se as partículas paramagnéticas unidas a anticorpos, que se vão unir aos complexos antigénio-anticorpo anteriormente formado;
- 3 - O EA não ligado é separado e aspirado;
- 4 - O ácido e a base são adicionados para iniciar a reação quimiluminescente e a concentração é calculada de acordo com a luz emitida.

Reação de Competição – antigénio marcado

- 1 – O antigénio marcado com EA compete com o antigénio da amostra por uma quantidade limitada de sítios de ligação ao anticorpo, o qual está unido covalentemente a PMP;
- 2 – Depois da incubação, a mistura de reação é exposta a um campo magnético, em que o EA não ligado é separado e retirado;
- 3 – O ácido e base são adicionados para iniciar a reação quimiluminescente e a concentração é calculada inversamente à luz emitida.

Reação de Competição – anticorpo marcado

- 1 – O antigénio unido a PMP compete com o antigénio da amostra por sítios limitados da ligação no anticorpo marcado com EA;
- 2 – Após incubação, a mistura de reação é exposta a um campo magnético, em que o EA não ligado é separado e retirado;
- 3 – O ácido e base são adicionados para iniciar a reação quimiluminescente e a concentração é calculada inversamente à luz emitida.

Captura de Anticorpo

Este método é utilizado quando o analito que se pretende medir é um anticorpo, usa um anticorpo especificamente dirigido ao anticorpo da amostra.

- 1 – Adicionam-se à amostra PMP unidas a um anticorpo específico de IgM humana (anticorpo anti IgM humana), assim os anticorpos da amostra são separados de outras substâncias que possam interferir;

2 – Adiciona-se o antígeno marcado com EA, que tem afinidade para os anticorpos da amostra;

3 – A fração não ligada separa-se da ligada e a concentração é medida através de uma relação direta com a emissão de luz¹¹.

TESTES REALIZADOS

Imunoglobulina E Total

A hipersensibilidade imediata de tipo I que, na classificação de Gell e Coombs, agrupa a anafilaxia e as doenças atópicas, caracteriza-se por uma produção excessiva de imunoglobulinas do tipo IgE (E de eritema). Estas IgE sensibilizam os mastócitos e os granulócitos basófilos que, sob a sua influência, rompem os grânulos, libertando os mediadores implicados na reação alérgica. O doseamento das IgE totais permite avaliar este fenómeno⁸.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur IgE Total é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimiluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos para a IgE. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo anti-IgE humana de cabra marcada com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo anti-IgE humana do rato, que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas⁵.

Folatos

O ácido fólico (ReGlu) consiste em 3 componentes básicos: um derivado pteridina, um resíduo p-aminobenzóico e um resíduo de ácido L-glutâmico. Antes do PteGlu desempenhar o seu papel de coenzima, tem de ser reduzido nas posições 7 e 8 para ácido dihidrofólico (H₂PteGlu) e, depois, para ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico (H₄PteGlu); 1 a 6 resíduos adicionais de ácido glutâmico devem, então, ser adicionados, através de ligações γ-peptídicas à metade L-glutamato (H₂PteGlu_n).

Os folatos estão amplamente distribuídos na natureza em forma reduzida, os poliglutamatos. A enzima conjugase, existente na mucosa intestinal, remove progressivamente os resíduos de ácido glutâmico de forma que os mono e di-glutamatos são absorvidos pelo jejuno proximal. Parte do folato plasmático é excretado na bÍlis e reabsorvido no jejuno. Uma produção considerável do folato do organismo está envolvida nesta circulação entero-hepática, pelo que, distúrbios do

trânsito intestinal, que diminuem a quantidade absorvida, facilmente, induzem carência de folato.

As fontes mais ricas em folatos são vegetais (espinafre, alface, brócolos, vagens), frutas (banana, melão e limão), cogumelos e proteínas animais (fígado e rins). São vitaminas extremamente termolábeis, ou seja, a cozedura por mais de 15 minutos destrói os folatos. As necessidades mínimas diárias são de 50µg, como as reservas do organismo são de cerca de 5000µg, pode desenvolver-se anemia megaloblástica após cerca de 3 a 4 meses de dieta carente.

As principais causas de deficiência de folatos são: ingestão diminuída (dieta pobre - falta de vegetais, alcoolismo, idade avançada, 1º a no de vida), absorção prejudicada (circuitos intestinais curtos, sprue tropical e não tropical, doença celíaca, enterite regional, defeitos congénitos da absorção de folato, drogas - contraceptivos orais, sulfasalazina, barbitúricos, fenitoína, álcool), utilização prejudicada (drogas antagonistas do ácido fólico - metotrexato, triantereno, trimetoprim, pirimetamina, álcool - deficiência enzimática congénita), necessidades aumentadas (gravidez, primeiro ano de vida, hipertiroidismo, doença hemolítica crónica, neoplasia, dermatite esfoliativa, hepatopatia) e perdas (diálise).

Os níveis do folato sérico e eritrocitário são usados para avaliar o status do folato. O nível de folato sérico é um indicador de ingestão recente de folato. O nível de folato eritrocitário é um melhor indicador dos depósitos de folato e a sua diminuição pode indicar uma deficiência prolongada em folato.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Folato é um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimiluminométrica direta. O folato na amostra do doente compete com o folato marcado com éster de acridina no Reagente Lite por uma quantidade limitada de proteína de ligação ao folato marcado com biotina. A proteína de ligação ao folato com biotina liga-se à avidina, que está ligada por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida. No ensaio ADVIA Centaur Folato, a amostra é previamente tratada para libertar o folato das proteínas de ligação endógenas na amostra⁵.

Vitamina B12

A vitamina B12, também chamada cianocobalamina (CN-Cbl), é uma molécula complexa formada por 2 porções major, um grupo consistindo em 4 anéis pirrólicos reduzidos - núcleo corrina - ligado em ângulos retos a um nucleótido invulgar. Os anéis pirrólicos ligam-se a um átomo central de cobalto. O nucleótido consiste numa base-5,6 dimetilbenzimidazol - ligada à ribose fosfato.



Esta vitamina é produzida por bactérias que habitam o tubo digestivo de animais, e existe, primariamente, em alimentos de origem animal. A Cbl produzida no intestino grosso humano não é aproveitada para absorção. As proteínas animais são a principal fonte dietética de Cbl (carne de órgãos parenquimatosos, peixe, músculo animal, produtos do leite e gema de ovo). A Cbl é, excepcionalmente, bem armazenada nos tecidos nas suas formas coenzimáticas.

A absorção faz-se na forma de coenzimas (5'desoxiadenosilcobalamina - Ado-Cbl - e metilcobalamina - Me-Cbl), inespecificamente ligados às proteínas, sendo o pH gástrico baixo essencial para a sua libertação. Na segunda porção do duodeno, as proteases pancreáticas degradam as proteínas, permitindo a ligação da vitamina B12 ao fator intrínseco (FI), produzido pelas células da mucosa gástrica. A mucosa do íleo terminal é responsável pela absorção do complexo vitamina B12-FI, através de recetores específicos.

As principais causas de carência de vitamina B12 são: ingestão diminuída (vegetarianismo estrito), absorção prejudicada (anemia perniciosa, gastrectomia total, deficiência congénita em fator intrínseco, doenças do íleo terminal, parasitoses competitivas, etc.) e transporte/utilização prejudicada (deficiência de transcobalamina II, defeito metabólicos congénitos do metabolismo da Cbl, drogas-óxido nitroso, etc.).

Na ausência de vitamina B12, o folato vai-se transformando em 5-metiltetrahydrofolato, inútil para a síntese do DNA, o que compromete a divisão celular em todos os tecidos do organismo, sendo responsável por anemia megaloblástica e manifestações neurológicas. A deficiência de vitamina B12 é clinicamente indistinguível da deficiência de folato.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur VB12 é um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimiluminescente direta na qual a vitamina B12 nas amostras dos doentes compete com a vitamina B12 marcada com éster de acridina no Reagente Lite por uma quantidade limitada de fator intrínseco purificado, o qual está ligado por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida. O ensaio utiliza Agente Libertador (hidróxido de sódio) e DTT para libertar a vitamina B12 das proteínas de ligação endógenas nas amostras e utiliza cobinamida para evitar uma nova ligação depois de ser adicionada Fase Sólida à amostra⁵.

Insulina

Segregada pelas células dos ilhéus de Langerhans pancreáticos, a insulina é a única hormona hipoglicemizante. Favorece o armazenamento e utilização da glicose pelo fígado, a captação da glicose pelas células periféricas e estimula a lipogénese.

A secreção da insulina é regulada por um mecanismo complexo em que intervém a glicemia, o glucagon e a hormona do crescimento.

Quando a produção de insulina é deficiente, a glicose acumula-se no sangue e na urina, destruindo as células por falta de abastecimento⁸.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur Insulina é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo monoclonal anti-insulina de rato marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo monoclonal anti-insulina de rato que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas⁵.

Anticorpo Anti HBs

O vírus da hepatite B está presente no sangue dos indivíduos infetados sob a forma de partículas de Dane. Estas partículas são constituídas por um «invólucro» contendo o antígeno de superfície HBs.

A cura desta hepatite é anunciada pela seroconversão do antígeno HBe, o antígeno HBs desaparece pouco depois dando lugar a anticorpos anti-HBs de classe IgM, substituídos pouco depois por anticorpos de classe IgG que persistem durante muitos anos após a cura, por vezes de forma isolada.

Este anticorpo encontra-se também presente em indivíduos imunizados pela vacina da hepatite B⁸.

Princípio do Teste

O ensaio Anti-HBs ADVIA Centaur é um imunoensaio em “sanduíche” que utiliza tecnologia de quimioluminometria direta. Os subtipos do HBsAg estão ligados por ligações covalentes a partículas magnéticas de látex na Fase Sólida. No Reagente Lite, os subtipos do HBsAg estão marcados com éster de acridínio. A partir do poço auxiliar, são adicionadas partículas não magnéticas de látex⁵.

Antigénio HBs

O vírus da hepatite B está presente no sangue dos indivíduos infetados sob a forma de partículas de Dane. Estas partículas são constituídas por um «invólucro» que contém o antigénio de superfície HBs. Este aparece seis semanas após a contaminação, duas a quatro semanas antes da icterícia. Em casos de cura desaparece antes do 3º mês. A sua permanência para além de seis meses é um sinal de portador assintomático⁸.

Princípio do Teste

O ensaio HBsAg ADVIA Centaur é um imunoensaio do tipo sanduíche que utiliza a tecnologia direta, quimioluminométrica. As partículas de látex não-magnéticas são adicionadas a partir do poço auxiliar. O Reagente Lite, acondicionado numa embalagem de reagentes auxiliares ReadyPack, contém um anticorpo monoclonal (rato) anti-HBs de captura biotínido e um anticorpo monoclonal (rato) anti-HBs marcado com éster de acridínio. O HBsAg nos complexos da amostra com os anticorpos e as partículas de látex magnéticas revestidas com streptavidina na fase sólida, capturam os complexos do anticorpo HBsAg⁵.

Estradiol (E2)

O estradiol é o principal estrogénio segregado durante o ciclo ovário pelos folículos de Graaf. É responsável pela manutenção dos tecidos do organismo, garantindo a elasticidade da pele e dos vasos sanguíneos e a reconstituição óssea, entre outras funções.

Numa escala mais baixa, a produção é assegurada pelas glândulas supra renais, os testículos, e pela conversão periférica dos androgénios.

Os recetores de estrogénios encontram-se em numerosos tecidos (ossos, glândulas mamárias, fígado, endométrio...). A síntese e a libertação do estradiol são estreitamente controladas pelo complexo hipotálamo-hipofisário, pelo intermédio da LHRH, da LH e da FSH.

Nos casos de suspeita de hipofertilidade tanto no homem como na mulher, a avaliação da taxa de estradiol, associada aos doseamentos de LH, de FSH e de progesterona, permite apreciar o funcionamento do eixo hipotálamo-hipofisogonadal e determinar o nível da sua integridade.

Na altura das estimulações ovarianas, com vista à reprodução medicamente assistida, o doseamento do estradiol permite seguir e apreciar a maturação folicular. O doseamento do estradiol, completado com o da LH e da FSH, permite afirmar o diagnóstico de menopausa.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur eE2 utiliza um formato de ensaio competitivo. O estradiol endógeno contido numa amostra é libertado das suas proteínas de ligação por um agente libertador. Depois, um anticorpo monoclonal antiestradiol marcado com éster de acridina é adicionado para ligar o estradiol disponível. Por fim, uma fase sólida de captação do derivado de estradiol é adicionada à reação para competir com o estradiol para ligação do anticorpo marcado com acridina. Após a lavagem, os reagentes ácidos e de base são distribuídos para iniciar a reação quimioluminescente⁵.

Hormona Foliculo-estimulante - FSH

A FSH é uma glicoproteína com peso molecular de, aproximadamente, 30 000 Daltons. A estrutura da FSH mostra a existência de 2 subunidades polipeptídicas α e β , unidas por ligações não covalentes.

A FSH é produzida de forma pulsátil pelas células gonadotróficas da hipófise anterior sob controlo do hipotálamo. É assegurado um retrocontrolo negativo principalmente pela inibina, cuja produção é estimulada pela FSH.

No homem, a FSH exerce a sua função em algumas células do tubo seminífero, as células de Sertoli, determinando a produção de ABP (Androgen Binding Protein) e da inibina.

Na mulher em idade fértil, a FSH em sinergia com a LH, intervém diretamente no desenvolvimento dos folículos ovarianos, aumentando a sua produção esteroideia e determina a ovulação. Além disso, a FSH estimula algumas células foliculares (células da granulosa) levando à produção de inibina. No início da menopausa, a produção de inibina (hormona produzida pelos testículos no homem, e pelos folículos ovarianos na mulher) diminui e observa-se um aumento importante do nível sérico de FSH.

O doseamento da FSH, associado ou não ao da LH, é um parâmetro essencial da exploração da função de amenorreica, taxas elevadas demonstrarão um hipogonadismo primário e taxas baixas devem levar à pesquisa de um hipogonadismo secundário.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur FSH é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos que têm especificidade em relação à molécula de FSH intacta. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo policlonal anti-FSH de ovelha marcada com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um

anticorpo monoclonal anti-FSH de rato que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas⁵.

Hormona Luteinizante - LH

A LH é uma glicoproteína com peso molecular de, aproximadamente, 30 000 Daltons. A estrutura da LH mostra a existência de 2 subunidades polipeptídicas α e β , unidas por ligações não covalentes.

A LH é produzida de forma pulsátil pelas células gonadotróficas da hipófise anterior sob controlo do hipotálamo. Uma regulação negativa é assegurada pelas hormonas esteroides, cuja produção é estimulada pela LH: testosterona no homem e o estradiol na mulher.

No homem, a LH exerce a sua função em células esteroideogénicas (células de Leydig) do testículo, estimulando assim a produção de testosterona.

Na mulher em idade fértil, a LH em sinergia com a FSH, intervém diretamente no desenvolvimento dos folículos ovarianos, aumentando a sua produção esteroideana e determina a ovulação. Na menopausa, a produção de estradiol diminui provocando o aumento da taxa sérica de LH.

O doseamento da LH, associado ou não ao da FSH, é um parâmetro essencial da exploração da função de amenorreica, taxas elevadas demonstrarão um hipogonadismo primário e taxas baixas devem levar à pesquisa de um hipogonadismo secundário.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur LH é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos que têm especificidade em relação à subunidade beta da molécula de LH intacta. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo monoclonal anti-LH de rato marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo monoclonal anti-LH de rato que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas⁵.

Progesterona

A progesterona é uma das principais hormonas esteroides segregadas pelo ovário feminino. Os seus índices aumentam depois da ovulação para alcançar o seu ponto máximo durante a fase luteínica.

Em caso de gravidez constitui-se um corpo amarelo secretor de progesterona indispensável à manutenção da gravidez, que é substituído cerca da 10ª semana pela secreção placentária.

A prova da progesterona constitui uma ajuda no diagnóstico de disfunções ovárias. No caso de suspeita de uma gravidez extrauterina, a associação da prova da progesterona e da HCG permite acrescentar sensibilidade ao diagnóstico.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur Progesterona é um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimiluminescente direta. A progesterona na amostra do doente liga-se a um anticorpo monoclonal antiprogesterona de rato marcado com éster de acridina no Reagente Lite. O anticorpo não ligado liga-se a um derivado da progesterona, ligado por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida⁵.

Prolactina

A prolactina é uma hormona polipeptídica de massa molecular de cerca de 23 000 daltons e composta por 198 aminoácidos. Sintetizada pelo lóbulo anterior da hipófise, a prolactina é segregada de forma pulsátil (todos os 20 minutos) e segue um ritmo circadiano, sendo os níveis mais elevados atingidos durante o sono. Pode apresentar-se sob diferentes formas: forma de monómero ou de dímero.

Vários fatores controlam a secreção de prolactina. Fisiologicamente, a secreção de prolactina é controlada pelo hipotálamo. A Dopamina e o GABA são os principais inibidores. A TRH (*thyrotropin releasing hormone*) e a VIP (*vasoactive intestinal peptide*) estimulam a secreção de prolactina. Fatores exógenos como o exercício físico, o *stress*, o jejum, a hipoglicémia, podem ser responsáveis por um aumento da taxa desta hormona.

O principal papel fisiológico da prolactina na mulher dá-se no início e durante o aleitamento. Está também implicada na maturação folicular e no desenvolvimento dos ovócitos.

No homem, tem ação ao nível das gónadas.

A hiperprolactinémia foi reconhecida como uma causa de infertilidade no homem e na mulher. As três formas de hiperprolactinémia são a iatrogénica, associada à administração de alguns medicamentos (antidepressivos, tranquilizantes...), a hiperprolactinémia primária associada a tumores hipofisários e a hiperprolactinémia secundária (hipertiróide, insuficiência renal...).

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur Prolactina é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo policlonal antiprolactina de cabra marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo monoclonal antiprolactina de rato que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas⁵.

Testosterona

No homem, a testosterona é o principal androgénio segregado pelas células testiculares de Leydig. A sua secreção é regulada pelas hormonas gonadotróficas hipofisárias sobre as quais a testosterona exerce um retrocontrolo negativo.

Na mulher, dois terços da testosterona resultam da transformação periférica da delta-4-androstenediona, a qual é segregada metade pelos ovários e metade pelas suprarrenais.

A testosterona circula no plasma ligada a uma proteína específica: a TEBG (Testosterone Estradiol Binding Globulin).

Doseia-se em caso de hipogonadismo (termo médico para um defeito no sistema reprodutor que resulta na diminuição da função das gónadas) no homem e de hirsutismo (definido como o crescimento excessivo de pelos em áreas anatómicas características de distribuição masculina) na mulher.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur Testosterona é um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimiluminescente direta. A testosterona na amostra do doente compete com a testosterona marcado com éster de acridina no Reagente Lite por uma quantidade limitada de anticorpo policlonal antitestosterona de coelho ligado ao anticorpo monoclonal anticoelho de rato, que está ligado a partículas paramagnéticas na Fase Sólida. O ensaio utiliza Agente Libertador de Testosterona para libertar a testosterona ligada das proteínas de ligação endógenas na amostra⁵.

TSH

A hormona tirotrófica ou hormona estimulante da tiroide (TSH) é uma glicoproteína com um peso molecular de 28 000 a 30 000 daltons. É constituída por duas sub-unidades peptídicas α e β ligadas de forma não covalente. A subunidade α que contém 92 ácidos aminados, é similar às da FSH, da LH e da hCG. A subunidade β ,

que contém 112 ácidos aminados, determina a especificidade biológica e imunológica da hormona. A estas subunidades peptídicas estão ligados resíduos glicosilados.

A produção de TSH é assegurada pelas células tirotróficas da hipófise anterior. A sua secreção na circulação sanguínea segue um ritmo circadiano que atinge o máximo entre a uma e as duas horas da manhã.

A TSH constitui o principal fator de estimulação da glândula da tiroide que determina a produção das hormonas T3 e T4. Em contrapartida, estas hormonas exercem um retrocontrolo da hipófise anterior que trava a secreção de TSH. A secreção desta hormona está, além disso, sob o controlo do sistema nervoso central pelo intermédio de um neuropéptido hipotalâmico, a TRH, e de neuromediadores como a somatostatina ou a dopamina.

No caso de hipertiroidismo, a concentração de TSH diminui fortemente, podendo mesmo ser indetetável. Em raras formas de hipertiroidismo de origem alta, o retrocontrolo negativo das hormonas tiroideias não produz efeitos e a taxa de TSH não diminui.

Nos casos de hipotiroidismo primitivo franco, a concentração da TSH é sempre nitidamente superior ao normal, acompanhada de uma diminuição das taxas das hormonas da tiroide.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur TSH3-Ultra é um ensaio da terceira geração que emprega anticorpo monoclonal anti-FITC ligado por covalência a partículas paramagnéticas, um anticorpo monoclonal de captura anti-TSH marcado com FITC e um traçador composto por um éster de acridina próprio e um anticorpo mAb anti-TSH conjugado com albumina de soro bovino (BSA) para deteção quimioluminescente⁵.

Triiodotironina - T3

A triiodotironina (T3) é uma hormona proveniente em parte da secreção tiroidiana (20%) e em maioria da desiodação periférica da T4 em T3 (80%). Sendo a T3 fisiologicamente muito mais ativa que a T4, contribui de forma importante para a manutenção da eutiroidia (estado em que há um nível normal de hormonas tiroideias).

A T3 circula de forma livre (0.3%) ou ligada a proteínas portadoras (>99,7%) tais como a TBG (*thyroxine binding globulin*), a albumina ou a pré-albumina. A forma livre é a fração fisiologicamente ativa e parece ter mais influência sobre o controlo metabólico.

O doseamento da T3 deve ser utilizado conjuntamente com outros testes, tais como o doseamento da TSH e da T4 assim como o exame clínico do paciente.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur T3 é um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia de quimiluminescência direta. A T3 na amostra do doente compete com a T3 análoga, que está ligada por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida, por uma quantidade limitada de anticorpo monoclonal anti-T3 de rato marcado com éster de acridina no Reagente Lite⁵.

T3 Livre

A T3 livre (FT3) não contribui para o diagnóstico do hipotiroidismo. Esta hormona tem um papel diagnóstico especialmente importante nos seguintes casos: Hipertiroidismo, seguimento de pacientes Hipotiroideus tratados com Tiroxina e com antitiroideus e no Síndrome de diminuição da T3.

O doseamento da T3 Livre deve ser utilizado conjuntamente com outros testes, tais como o doseamento da TSH e da T4 Livre assim como o exame clínico do paciente.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur FT3 é um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimiluminescente direta. A FT3 na amostra compete com uma T3 análoga, que está ligada por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida, por uma quantidade limitada de uma combinação de anticorpos monoclonais anti-T3 de rato marcados com éster de acridina no Reagente Lite⁵.

Tiroxina - T4

A tiroxina (T4) é uma hormona proveniente da secreção tirodiana e cuja maior parte está ligada a proteínas portadoras (99,9%), principalmente a TBG (*thyroxine binding globulin*). A fração livre é considerada como a parte ativa da hormona.

A determinação da T4 é uma ajuda à exploração da função tirodiana, caracterizado por uma diminuição da concentração em caso de hipotiroidismo e de um aumento da concentração durante um hipertiroidismo.

Este doseamento deve estar igualmente associado aos doseamentos de TSH e da T3 assim como o exame clínico do paciente.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur T4 é um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia de quimiluminescente direta. A T4 na amostra do doente compete com a T4, que está ligada por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida, por uma quantidade

limitada de anticorpo monoclonal anti-T4 de rato marcado com éster de acridina no Reagente Lite⁵.

T4 Livre

A fração da T4 que permanece livre (FT4) é considerada como a parte ativa da hormona. Os mecanismos da regulação da função tiroideia agem diretamente na concentração desta fração livre, o que explica a sua independência relativa em relação à concentração em proteínas portadoras.

No hipertiroidismo, a concentração em T4 livre aumenta, enquanto no hipotiroidismo a concentração está geralmente mais baixa.

Os pacientes sob hormonoterapia substitutiva (LT4) podem apresentar um aumento da T4 livre mesmo se clinicamente eutiroideos.

Este doseamento deve estar igualmente associado aos doseamentos de TSH e o exame clínico do paciente.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur FT4 é um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimiluminescente direta. A FT4 na amostra do doente compete com a T4 marcada com éster de acridina no Reagente Lite por uma quantidade limitada de anticorpo policlonal anti-T4 biotinilado de coelho. A anti-T4 marcada com biotina está ligada à avidina, que está ligada por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida⁵.

Anticorpo Anti-Tiroglobulina

A tiroglobulina é uma glicoproteína e é a principal constituinte do coloide da tiroide (carcinoma diferenciado), com um peso de 660 kD. A tiroglobulina é o suporte da síntese, do armazenamento e da libertação das hormonas tiroideias.

A presença de anticorpos antitiroglobulina constituem a prova de várias afeções na tiroide⁸.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur Anti-Tg é um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia de quimiluminescente direta. O autoanticorpo da tiroglobulina na amostra do doente compete com o anticorpo policlonal anti-Tg humano ligado a um anticorpo policlonal anti-humano de cabra ligado por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida por uma quantidade limitada de tiroglobulina humana marcada com éster de acridina no Reagente Lite⁵.

Anticorpo Anti-Tiroperoxidase

A tiroperoxidase (TPO) é a principal enzima envolvida no procedimento de síntese das hormonas da tiroide, é uma glicoproteína, expressa apenas em células foliculares da tiroide. E é o principal antigénio na partícula microssomal da tiroide.

Os anticorpos antitiroperoxidase estão presentes em 4 a 9% dos adultos normais, em 57-74% dos pacientes com doença de Graves, em 99-100% dos pacientes com doença de Hashimoto ou mixedema idiopático, em 19% dos casos de tumores diferenciados de tiroide e, raramente, em pacientes com tiroidite subaguda. A prevalência de positividade em pacientes idosos (80 anos) é mais alta nas mulheres (10%) em comparação com os homens (2%)⁸.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur Anti-TPO é um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimiluminescente. O autoanticorpo da peroxidase da tiroide na amostra do doente compete com o anticorpo monoclonal anti-TPO de rato ligado por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida por uma quantidade limitada de TPO humana em complexo com um anticorpo anti-TPO de rato marcado com éster de acridina no Reagente Lite⁵.

Alfafetoproteína - AFP

A alfa-fetoproteína é uma glicoproteína (alfa-1-globulina), com um peso molecular de cerca de 67 kD, sintetizada pelo fígado, é a principal proteína do soro fetal, daí o seu nome. Possui muitos epítotos. É reconhecida por numerosos anticorpos, tanto policlonais como monoclonais e tem um tempo de semivida de 5 a 6 dias.

O seu reaparecimento na criança ou no adulto observa-se nos cancros do fígado e do testículo, sem dúvida devido à ausência de repressão do gene que codifica para essa proteína.

Constitui a 1ª escolha como marcador nos hepatomas, tumores germinais do ovário e tumores germinais do testículo (não seminomas). Pode também estar aumentado devido a causas não oncológicas, como hepatopatia crónica e gravidez.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur AFP é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimiluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo policlonal de afinidade purificado anti-AFP de coelho marcado com éster de acridina. O

segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo monoclonal anti-AFP de rato ligado por covalência a partículas paramagnéticas⁵.

CA 15.3

O CA 15.3 é uma glicoproteína circulante associada aos câncros da mama, com um peso molecular de 300-450 kD. É reconhecido por dois anticorpos monoclonais (DF3 e 115D8), um dirigido contra a fração rica em antígenos membranares do cancro da mama, o outro contra as lipoproteínas do leite humano. Constitui uma segunda escolha como marcador para o rim. Pode apresentar-se aumentado devido a causas não oncológicas, como as hepatopatias.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur CA 15-3 é um imunoensaio totalmente automatizado do tipo sanduíche, efetuado em duas etapas, que recorre à tecnologia quimiluminométrica direta. O Reagente Lite é composto por um anticorpo monoclonal de rato, o DF3, específico para o CA 15-3, marcado com éster de acridina. O Reagente Conjugado é composto por um anticorpo monoclonal de rato, o 115D8, específico para o CA 15-3, marcado com fluoresceína.

A Fase Sólida é composta pelo anticorpo monoclonal de captura de rato purificado, que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas. A amostra fica a incubar com Reagente Conjugado e Fase Sólida simultaneamente durante 20 minutos. Após a incubação, o imunocomplexo é lavado e o Reagente Lite é adicionado, fica a incubar durante outros 20 minutos e depois é novamente lavado. Este protocolo de duas etapas elimina o efeito de gancho de dose elevada neste ensaio⁵.

CA 125

O CA 125 é uma glicoproteína circulante associada aos câncros do ovário (adenocarcinoma seroso), tem um peso molecular de cerca de 500 kD e possui um tempo de semivida de cerca de 5 dias.

Pode estar aumentado em causas não oncológicas, como a menstruação, cirroses ascitogénicas, derrames pleurais, peritoneais e pericárdicos, insuficiência cardíaca congénita, síndrome de Meigs e pneumonite.

Princípio do Teste

O ADVIA Centaur CA 125 II é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimiluminométrica direta e que utiliza dois anticorpos monoclonais de rato específicos para CA 125. O primeiro anticorpo visa o domínio

antigénico do M11 e está marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo visa o domínio antigénico do OC 125 e está marcado com fluoresceína. O imunocomplexo formado com a CA 125 é capturado pelo anticorpo antifluoresceína monoclonal de rato ligado a partículas paramagnéticas na Fase Sólida⁵.

CA 19.9

O CA 19.9 ou GICA (gastro-intestinal carbohydrate antigen) é uma glicoproteína circulante com um peso molecular de cerca de 360 kD, associada aos cancros do pâncreas, estômago, vias biliares e bexiga. Pode ser utilizado como segunda escolha nos cancros do cólon, reto e rim. Encontra-se também aumentado em certas situações não oncológicas, como, icterícia, patologia benigna do tubo digestivo, do pâncreas, do fígado e das vias biliares, patologia benigna do pulmão, nefropatia diabética, diabetes mal controlada e doenças reumáticas.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur CA 19-9 é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em duas etapas que recorre à tecnologia quimiluminométrica direta e que utiliza um único anticorpo monoclonal, o 1116-NS19-9, tanto para a Fase Sólida como para o Reagente Lite. O anticorpo é ligado por covalência a partículas paramagnéticas na Fase Sólida e o mesmo clone de anticorpo é marcado com éster de acridina no Reagente Lite. A amostra e a Fase Sólida ficam a incubar a uma temperatura de 37°C durante 7,5 minutos, seguindo-se uma etapa de lavagem para remover o excesso de antigénios não ligados. O Reagente Lite reage então com os antigénios CA 19-9 ligados na Fase Sólida durante uma incubação adicional de 20 minutos. Por isso, o efeito de gancho de dose elevada é eliminado neste ensaio⁵.

Antigénio Carcinoembrionário - CEA

O antigénio carcinoembrionário (CEA) é um antigénio circulante com um peso molecular de cerca 200Kd, possui um tempo de semivida de 6-8 dias associado aos cancros tiroide (indiferenciado), pulmão (adenocarcinoma), cólon e reto, ovário (adenocarcinoma mucinoso) e endométrio (adenocarcinoma). Pode ser utilizado como segunda escolha nos cancros do esófago (adenocarcinoma), do estômago, do pâncreas, das vias biliares e da mama.

Encontra-se também aumentado em certas situações não oncológicas, como patologia benigna do tubo digestivo e do fígado, patologia benigna do pulmão, insuficiência renal crónica.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur CEA é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimiluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo policlonal purificado anti-CEA de coelho marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo monoclonal anti-CEA de rato ligado por covalência a partículas paramagnéticas⁵.

Antigénio específico da próstata - PSA

Este antigénio é uma glicoproteína segregada pelas células glandulares da próstata e não se encontra em qualquer outro tecido.

Como marcador da próstata eleva-se em todas as infeções prostáticas em evolução (adenoma, prostatite e cancro) mas o seu aumento é muito mais importante e mais rápido em caso de cancro.

Assim, o doseamento do PSA é o melhor meio de despistagem do cancro da próstata.

PSA fração livre

Este antigénio é uma glicoproteína (7-12% resíduos de carboidratos), com um peso molecular de 29kD, usa-se exclusivamente em relação ao PSA total: relação mais alta na hipertrofia benigna (HBP), mais baixa no cancro; utiliza-se apenas quando o PSA total se situa entre 4 e 20 µg/l (ng/ml).

É reconhecida por anticorpos monoclonais.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur PSA é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimiluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um anticorpo policlonal anti-PSA de cabra marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo monoclonal anti-PSA de rato que está ligado por covalência a partículas paramagnéticas⁵.

Paratormona - PTH

A paratormona contribui para manter a calcemia normal. Ao nível dos ossos, aumenta a absorção óssea estimulando os osteoclastos e deprimindo a atividade dos osteoblastos; ai nível dos rins, estimula a reabsorção do cálcio e aumenta a fosfatúria. A sua secreção é regulada pela calcemia⁸.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur PTH Intacta é um imunoenensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimiluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos anti-PTH humana no Reagente Lite. O primeiro anticorpo é um anticorpo policlonal anti-PTH humana de cabra (N-terminal 1-34) marcado com éster de acridina. O segundo anticorpo é um anticorpo policlonal anti-PTH humana de cabra biotilado (região 39-84). A estreptavidina na Fase Sólida é ligada por covalência a partículas paramagnéticas de látex⁵.

Anticorpo Anti – Vírus da Hepatite C (VHC)

A hepatite C transmite-se habitualmente pelo sangue e excecionalmente por via sexual. Foi durante muito tempo a hepatite pós-transfusional mais frequente. Atualmente o risco de contágio pós-transfusional é fraco, devido à obrigatoriedade de despiste para todos os dadores de sangue.

O diagnóstico desta hepatite assenta essencialmente na deteção de anticorpos anti-VHC, o qual se encontra presente apenas em pessoas que contactaram com o vírus⁸.

Princípio do Teste

O ensaio ADVIA Centaur VHC é um imunoenensaio indireto do tipo sanduíche de duas lavagens utilizado para a deteção do anticorpo IgG do vírus da hepatite C (VHC) no soro ou plasma humano.

O ensaio ADVIA Centaur VHC utiliza dois antígenos do VHC recombinantes codificados (c200 e NS5) e um péptido (c22) de núcleo codificado de VHC sintético. A proteína c200 deriva de ambas as sequências NS3 e NS4. Há pelo menos dois epítomos principais localizados nas regiões NS3 e NS4. Estes dois importantes epítomos específicos foram extensivamente estudados e revelaram ser importantes para a deteção de anticorpos em indivíduos infetados pelo VHC. O antígeno NS5 é derivado de uma parte suposta de polimerase de ARN do genoma do VHC. Um número significativo de indivíduos infetados com VHC desenvolve uma resposta imunológica ao NS5. O péptido c22 é uma sequência de aminoácidos derivada da região nuclear do genoma. Este péptido contém o principal epítomo nuclear do VHC. Uma resposta imunológica á proteína nuclear á muitas vezes um indicador precoce de infeção por VHC⁵.

VIDAS – BIOMERIEUX

O VIDAS é um sistema multiparamétrico de imunoensaio com 5 secções diferentes, tendo cada uma seis posições de teste, o que permite que diversos parâmetros sejam efetuados em simultâneo. As análises podem ser realizadas teste a teste ou em série.

Este equipamento utiliza o método imunoenzimático por



Figura 8 - VIDAS

sanduíche com deteção final por fluorescência (ELFA). A reação decorre em fase sólida (cone), os determinantes antigénicos/anticorpos da amostra são capturados pelas imunoglobulinas monoclonais/antigénios fixados no cone, após a lavagem dos componentes não fixados, o anticorpo marcado com fosfatase alcalina liga-se aos determinantes antigénicos. Uma segunda lavagem elimina o conjugado não fixado. Durante a etapa final de revelação, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) é hidrolisado a 4-metil-umbeliferona, sendo a reação catalisada pela enzima do conjugado. O produto final emite fluorescência proporcional à concentração dos determinantes antigénicos¹¹.

TESTES REALIZADOS

Anticorpos Anti-HVA (IgM e IgG)

A Hepatite A é uma doença aguda do fígado, causada pelo vírus da hepatite A (HVA), geralmente de curso benigno.

A transmissão é feita pela ingestão de alimentos mal cozinhados e águas contaminadas por fezes que contenham o vírus (transmissão fecal-oral), sendo também transmitido por via sexual.

O diagnóstico da hepatite A assenta na deteção de anticorpos anti-HVA da classe IgM pois esses anticorpos são detetáveis desde os primeiros sinais clínicos, persistindo

dois ou três meses. Os anticorpos da classe IgG aparecem no soro pouco depois de IgM e persistem toda a vida.

A pesquisa sistemática de IgG anti-HVA na população adulta em geral tem mostrado uma elevada frequência das formas assintomáticas⁸.

Cortisol

O Cortisol é uma hormona corticosteroide da família dos esteroides, produzida pela parte superior da glândula suprarrenal, diretamente envolvida na resposta ao stress.

A sua forma sintética, chamada de *hidrocortisona*, é um anti-inflamatório usado principalmente no combate às alergias, a artrite reumatoide e alguns tipos de cancro.

O nome *cortisol*, deriva de *córtex*.

Tem três ações primárias: estimula a quebra de proteínas, gorduras e é responsável pela metabolização da glicose no fígado. Considerada a hormona do stress, ativa respostas do corpo perante situações de emergência para ajudar a resposta física aos problemas, aumentando a pressão arterial e o açúcar no sangue, de forma a aumentar a energia muscular. Ao mesmo tempo todas as funções anabólicas de recuperação, renovação e criação de tecidos são paralisadas e o organismo concentra-se na sua função catabólica para a obtenção de energia. Uma vez que o stress é pontual, ultrapassado o problema, os níveis hormonais e o processo fisiológico volta à normalidade, mas quando este se prolonga, os níveis de cortisol no organismo aumentam.

Anticorpos Anti Epstein Barr – VCA (IgM e IgG)

O Epstein Barr é um vírus pertencente à família Herpesviridae, que apresenta tropismo para os linfócitos B. A primoinfeção pode ser assintomática, mas pode também manifestar-se através da mononucleose infecciosa e em casos muito específicos pode conduzir a síndromas linfoproliferativos do tipo linfoma.

É um vírus ubiqüitário e com distribuição mundial e a infeção por este vírus transmite-se pela saliva e objetos contaminados.

Entende-se por VCA - Antígeno da Cápside Viral, que é uma proteína estrutural.

As IgM anti-VCA são sintetizadas nas infeções assintomáticas e na Mononucleose Infecciosa, enquanto as IgG anti-VCA são sintetizadas em todo o tipo de patologias associadas ao EBV⁵.

Antigénio e Anticorpo HBe

Este antigénio indica-nos em geral uma replicação viral ativa do vírus da hepatite B, os hepatócitos cujo DNA integrou o DNA do vírus produzem uma grande quantidade de antigénios HBs e HBe que se encontram no sangue com o DNA viral. As lesões hepáticas são discretas porque nesta fase a resposta imunitária permanece fraca. Após alguns anos de evolução a presença do anticorpo HBe indica o fim da replicação viral e o aumento da resposta imunitária.

O antigénio Hbe aparece ao mesmo tempo que o antigénio HBs e desaparece antes dele, sendo a sua persistência para além de três meses, sinal de doença crónica⁸.

Anticorpos Anti Citomegalovírus (IgM e IgG)

O Citomegalovírus faz parte da família dos herpesvírus, pode causar patologias graves tanto na criança como no adulto. O CMV pode persistir no organismo de uma pessoa infetada durante anos e causar infeções recorrentes ou ser transmitido a outra pessoa. O CMV é um vírus que se encontra frequentemente (60 a 85% da população está infetada), no entanto a maioria dos casos são assintomáticos.

A deteção das IgM anti-CMA é útil no diagnóstico das infeções primárias recentes, especialmente na mulher grávida. As IgM anti-CMV presentes em cerca de 70% das primo-infeções, persistem, em geral, 16 a 20 semanas após a infeção e podem surgir novamente, de forma inconstante, durante as reativações.

A deteção das IgG anti-CMV é uma ajuda ao diagnóstico da infeção pelo CMV e na avaliação do estatuto imunitário dos doentes⁵.

Anticorpos Anti HIV I e II

O HIV (vírus da imunodeficiência humana) é o agente da SIDA, é um retrovírus com tropismo para os linfócitos T CD4.

O método mais simples para o diagnóstico do HIV é a determinação da presença de anticorpos, no entanto como não são detetados os antigénios virais, não permite reconhecer a infeção na sua fase mais precoce, isto é antes da formação de anticorpos. Esta fase pré serológica dura em média três semanas e não excede normalmente as seis semanas⁸.

Anticorpos Anti HBc (Total e IgM)

O vírus da hepatite B está presente no sangue dos indivíduos infetados sob a forma de partículas de Dane. Estas partículas são constituídas por um «invólucro» contendo o antigénio de superfície HBs e um «centro» que contém o antigénio HBc.

O antigénio HBc só pode ser detetado no sangue quando a partícula de Dane se desenbarçou do seu invólucro pelos detergentes, o que não se realiza na prática corrente. Pelo contrário, a presença do anticorpo anti-HBc é fácil de evidenciar no soro.

O anticorpo anti-HBc do tipo IgM, aparece pouco tempo depois do antigénio HBs e raramente persiste mais de três meses. O anticorpo IgG anti-HBc aparece ao mesmo tempo e persiste no soro qualquer que seja a evolução, para a cura ou para a cronicidade. Os anticorpos anti-HBc não são protetores; são simplesmente testemunhas da doença⁸.

Anticorpos Anti Toxoplasmose (IgM e IgG)

O *Toxoplasma gondii*, protozoário, parasita intracelular obrigatório, é um protozoário muito frequente no homem. O parasita, cujo hospedeiro definitivo é o gato, encontra-se disseminado na natureza e infeta inúmeros outros mamíferos.

A toxoplasmose é geralmente muito discreta no indivíduo imunocompetente, mas os danos fetais, como nos imunodeprimidos, porém podem ser severos. A toxoplasmose congénita devida a uma contaminação maternal pré-concepcional é excecional e ocorre frequentemente nas mulheres imunodeprimidas. As que são seronegativas são suscetíveis de serem infetadas durante a gravidez. A transmissão que pode ocorrer ao feto, resulta da passagem transplacentária de toxoplasma durante a fase aguda da doença. A frequência e a gravidade dos danos fetais dependem de vários fatores, entre os quais, a data do aparecimento da infeção maternal, a violência da estirpe infetante, a importância do inócuo e a qualidade da resposta imunitária da mãe.

O diagnóstico de uma infeção por *Toxoplasma gondii* baseia-se essencialmente na exploração laboratorial: deteção das imunoglobolinas específicas (IgM e IgG).

O diagnóstico de uma infeção aguda adquirida durante a gravidez far-se-á pela deteção de uma seroconversão, ou por um aumento significativo do título de anticorpos detetados em duas colheitas sequenciais analisadas em paralelo⁵.

Anticorpos Anti Rubéola (IgM e IgG)

A infecção pelo vírus da rubéola, tanto nas crianças como nos adultos, é benigna e de curta duração. Pode, no entanto, ter consequências muito graves para o feto (infecção congénita) se for contraída por uma mulher grávida, sobretudo se a infecção surgir durante os três primeiros meses de gravidez.

O diagnóstico de uma infecção rubeólica baseia-se essencialmente na serologia e, particularmente, na pesquisa das IgM específicas: na maioria dos casos a presença de IgM antirrubéola está correlacionada com uma primoinfecção recente.

A deteção das IgG antirrubéola é uma ajuda ao diagnóstico da infecção pelo vírus da rubéola e na avaliação do estatuto imunitário dos doentes no que diz respeito a este vírus⁵.

β – HCG

A hormona coriogonadotrófica (hCG) é uma glicoproteína com um peso molecular de cerca de 40 kD (19 a subunidade beta), segregada pelo sinciciotrofoblasto que mantém durante o 1.º trimestre da gestação a secreção do corpo amarelo, até que a placenta o substitua. Esta hormona surge 48 horas após a implantação do ovo.

O seu doseamento no sangue permite assim realizar o diagnóstico precoce da gravidez. A β -hCG serve também de marcador tumoral porque é segregada por certos tumores trofoblásticos ou testiculares, está associada aos tumores do ovário (coriocarcinoma, tumor de células germinais), trofoblasto (mola hidatiforme) e testículo (não seminomas, 25% dos seminomas).

É reconhecido por numerosos anticorpos tanto policlonais como monoclonais tanto para a molécula inteira como para a subunidade beta.

MINICAP

O MINICAP é um aparelho completamente automático, com leitura de códigos de barras, que faz a separação das frações das proteínas usando um sistema de dois capilares (eletroforese capilar) ¹¹.



Figura 9 - MINICAP

ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese é definida como o transporte, em solução eletrolítica, de compostos carregados eletricamente sob a influência de um campo elétrico, no qual a separação entre dois solutos ocorre de acordo com diferenças entre suas mobilidades eletroforéticas. O uso de capilares com diâmetros internos extremamente pequenos (na faixa de 15-100µm) permite uma melhor dissipação do calor e, assim, é possível obter uma alta eficiência de separação com tempo reduzido de análise.

A eletroforese capilar permite separar as proteínas séricas totais em 6 frações distintas: Albumina, Alfa 1, Alfa 2, Beta 1, Beta 2 e Gama globulinas.

A banda da albumina é relativamente homogênea, porém as demais são compostas por uma mistura de diferentes proteínas.

Albumina

É a proteína mais abundante no plasma, correspondendo a cerca de 60% da concentração total de proteínas. É sintetizada exclusivamente pelo fígado, aparecendo primeiro no citoplasma dos hepatócitos como um precursor chamado pró-albumina. Possui um papel muito importante em diversas funções do organismo, como o transporte de diferentes substâncias e em especial a manutenção da pressão oncótica.

Foram descritas mais de 20 variantes genéticas de albumina. O tipo mais comum é chamado albumina A. Essas albuminas variantes podem resultar numa faixa de albumina larga na eletroforese de proteínas séricas ou podem dar origem a duas faixas distintas (bisalbuminemia). Nenhuma dessas variantes foi ainda associada a manifestações patológicas. Na rara síndrome de ausência congênita de albumina, os

pacientes podem apresentar edema moderado, mas podem evitar as consequências hemodinâmicas com a utilização de mecanismos compensatórios, como o aumento das globulinas do plasma, que assumem algumas das funções da albumina. O problema bioquímico principal nesses pacientes é uma alteração no metabolismo lipídico, com aumento de colesterol, fosfolipídios e outras lipoproteínas.

Uma hiperalbuminémia pode corresponder a desidratação, enquanto uma hipoalbuminémia pode dever-se a uma redistribuição do fluido intracelular para o compartimento extracelular, retenção de água, síntese diminuída (resposta inflamatória aguda e crónica, insuficiências cardíaca e renal, perdas intestinais ou outras perdas, cirrose hepática avançada e neoplasias).

Alfa-1-Globulinas

A alfa-1-antitripsina corresponde a cerca de 90% das proteínas que se encontram na faixa das alfa-1-globulinas. A deficiência da alfa-1-antitripsina está associada ao enfisema pulmonar e à cirrose hepática. Só é detetável pela eletroforese quando homozigótica; os estados heterozigóticos só podem ser identificados por técnicas imuno-enzimáticas que também são utilizadas para confirmação das deficiências homozigóticas.

É uma das proteínas de fase aguda e pode ser encontrada noutros fluidos orgânicos, como lágrimas, sémen e líquido amniótico. Nos 10% restantes, estão a alfa-1-glicoproteína ácida, a alfa-fetoproteína e outras proteínas. Os níveis elevam-se nas doenças inflamatórias agudas e crónicas, neoplasias, após traumas ou cirurgias e durante a gravidez ou estrogénioterapia. Nos hepatocarcinomas, a elevação pode acontecer pelo aumento da alfa-fetoproteína.

Alfa-2-Globulinas

Inclui a haptoglobina, a alfa-2-macroglobulina e a ceruloplasmina. Raramente se encontram alterações nesta banda eletroforética, já que a diminuição de um componente é compensada pelos demais mesmo dentro da banda de referência. Níveis elevados de alfa-2-macroglobulina associados à diminuição da albumina acontecem na síndrome nefrótica.

Os níveis de haptoglobina e de ceruloplasmina podem apresentar-se elevados em numerosas situações que levam à reação de fase aguda. Os níveis de haptoglobina apresentam-se diminuídos nas hepatopatias graves, na anemia megaloblástica, em situações de aumento da hemoglobina livre, como na hemólise de eritrócitos ou na reabsorção de grandes hematomas e na terapia com estrogénios e corticoides. Os

níveis de ceruloplasmina aumentam na estrogênio-terapia e encontram-se diminuídos na doença de Wilson, na desnutrição, no síndrome nefrótico e nas enteropatias com perda de proteína.

A intensidade da banda α_2 pode estar aumentada e estender-se para o cátodo quando se formam os complexos hemoglobina-haptoglobina. Neste caso a amostra está normalmente hemolisada.

Betaglobulinas

Composta pelas beta-lipoproteínas (LDL), transferrina, C3 e outros componentes do complemento, beta-2-microglobulina e antitrombina III. A redução desta banda não é frequente e a sua variação é proporcional à concentração de transferrina. A anemia por deficiência de ferro leva ao aumento da transferrina. O hipotireoidismo, a cirrose biliar, as nefroses e alguns casos de diabetes mellitus podem evidenciar-se pelo aumento do colesterol e conseqüente aumento das beta-lipoproteínas (LDL). A beta-globulina está frequentemente elevada nos casos de icterícia obstrutiva e menos frequentemente em alguns casos de hepatite. Quase sempre, está elevada nos casos de cirrose hepática. Nesses casos, pode aparecer junto com sobreposição ou fusão das bandas beta e gama pelo aumento de IgA, que ocorre nas cirroses hepáticas, infecções da pele ou trato respiratório e na artrite reumatoide. Elevações causadas provavelmente pelo aumento dos componentes do complemento podem ocorrer na hipertensão maligna, doença de Cushing, poliartrite nodosa e carcinomas.

Gamaglobulinas

As gamaglobulinas são compostas pelas imunoglobulinas, predominantemente pela IgG. As imunoglobulinas A, M, D, E e a proteína C reativa encontram-se na área de junção beta-gama. A ausência ou a diminuição da banda gama indica imunodeficiências congénitas ou adquiridas. O aumento desta banda sugere o aumento policlonal das gamaglobulinas associadas a doenças inflamatórias crónicas, reações imunes, doenças hepáticas ou neoplasias disseminadas.

Bandas oligoclonais podem eventualmente ser observadas em infecções virais crónicas, em algumas infecções bacterianas como as pneumonias por pneumococos e as hepatites crónicas ativas.

Tuberculose, sarcoidose, linfogranuloma venéreo e sífilis terciária são doenças crónicas que levam ao aumento desta banda. Artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistémico e outras colagenoses podem apresentar níveis normais a acentuadamente aumentados, dependendo da fase de atividade da doença. Níveis aumentados



TESTE PARA DETEÇÃO DE TREPONEMA PALLIDUM – VDRL RPR NOSTICON II

Treponema pallidum é uma espécie de bactéria gram-negativa do grupo das espiroquetas e o agente causador da Sífilis.

O RPR-nosticon II é um teste de floculação não treponema macroscópico e é utilizado para detetar a reagina (anticorpo presente no sangue de doentes de sífilis responsável pela reação positiva a certos testes serológicos). Quando se mistura uma gota de soro positivo e de reagente numa lâmina de teste, formam-se flóculos pretos que são visíveis macroscopicamente devido à presença de partículas de carbono. Quando o anticorpo reagina não está presente, a floculação não ocorre e aparece uma cor cinzenta uniforme⁵.

TESTE PARA DETEÇÃO DE FATOR REUMATOIDE – WALLER ROSE POLYARTEST FUMOZE

O Polyartest Fomouze é um kit de teste de hemaglutinação rápido, para detetar o fator reumatoide (RF) no soro humano. O fator reumatoide (FR) encontra-se no soro de doentes com artrite reumatoide.

O Fator reumatoide também tem atividade contra a IgG animal. Devido à variedade de fatores reumatoides não há um único teste que os consiga detetar todos.

O reagente do teste Polyartest Fomouze é uma suspensão de células sanguíneas de ovelha estabilizadas com IgG de coelho antiovelha.

Quando o fator reumatoide está presente na amostra é visível uma aglutinação⁵.

HEMATOLOGIA

EQUIPAMENTOS ANALÍTICOS - MÉTODOS E TÉCNICAS UTILIZADOS

SYSMEX XT 180i

Este analisador automático é utilizado para a realização de Hemogramas e utiliza a citometria de fluxo fluorescente e tecnologias orientadas de hidrodinâmica. Utiliza um laser de diodo conseguindo a sensibilidade necessária para medir e diferenciar os tipos de células no sangue total e também de amostras de fluidos corporais.



Figura 11 – SYSMEX XT 180i

Sendo assim permite fazer: contagem de glóbulos vermelhos, hemoglobina, índices hematimétricos, hematócrito, plaquetas (distinguindo formas anormais), contagem de glóbulos brancos e fórmula leucocitária. As amostras de sangue total para este analisador são colhidas em tubos com anticoagulante EDTA K3. O analisador tem a capacidade de analisar 80 amostras/hora¹¹.

HEMOGRAMAS

O hemograma dá-nos uma análise quantitativa (contagem dos elementos celulares por unidade de volume de sangue – glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas) e uma análise qualitativa (contagem diferencial das subpopulações leucocitárias).

HEMATOPOIESE

A Hematopoiese é o conjunto de mecanismos que asseguram a substituição contínua e regulada das diferentes células sanguíneas. Constitui o sistema celular que conduz à formação de todas as células do sangue.

O pool mais primitivo é constituído por Células tronco pluripotenciais, com a capacidade de autorrenovação contínua. O pool mais maduro é constituído por Células progenitoras diferenciais unipotenciais, com maturação restrita a uma única linhagem celular e sem capacidade de autorrenovação.

As células estaminais (*stem cells*) são as mais primitivas e podem originar qualquer uma das linhagens celulares ou mais *stem cells*.



O 1.º local de hematopoiese embrionária é o saco vitelino, contendo células com capacidade de se diferenciar em multilinhagens no 8.º dia de gestação. O 2.º local é o fígado fetal.

As cavidades ósseas aparecem por volta do 5.º mês de gestação e tornam-se no local exclusivo para a proliferação de granulócitos e megacariócitos. Nesta altura, a atividade eritropoiética ocorre exclusivamente no fígado (até final do último trimestre).

Ao nascer, as cavidades ósseas são o único local de significativa atividade hematopoiética. Por volta dos 4 anos, aparecem células goradas nas diáfises dos ossos longos, que respondem lentamente aos elementos hematopoiéticos. A partir dos 18 anos, a medula hematopoiética só pode encontrar-se nas vértebras, costelas, crânio, pélvis e epífises proximais do fémur e úmero

Diferentes etapas da evolução das células hemopluripotenciais:

Diferenciação = alteração nas células multipotenciais até aos progenitores unipotenciais.

Determinação = momento impossível de fixar exatamente, em que duas células tomam um caminho definido que não se traduz em fenótipo característico. É irreversível.

Maturação = conjunto de fenómenos que levam a célula do momento da determinação, àquele em que ela assume as suas características.

Amplificação = uma célula determinada, não pode evoluir senão numa direção. Ao dividir-se origina células-filhas semelhantes a si.

Modulação = as células determinadas podem tomar diferentes aspetos morfológicos, se o seu ambiente se alterar.

Todas as células sanguíneas têm origem em células indiferenciadas – blastos.

As células primitivas mudam para as formas de células mais maduras; elas sofrem alterações nas características citoplasmáticas e nucleares, diminuem de tamanho, o tamanho absoluto e relativo do núcleo diminui (na série eritrocitária, o núcleo desaparece) e a intensidade do corante absorvido pelo citoplasma diminui⁴.

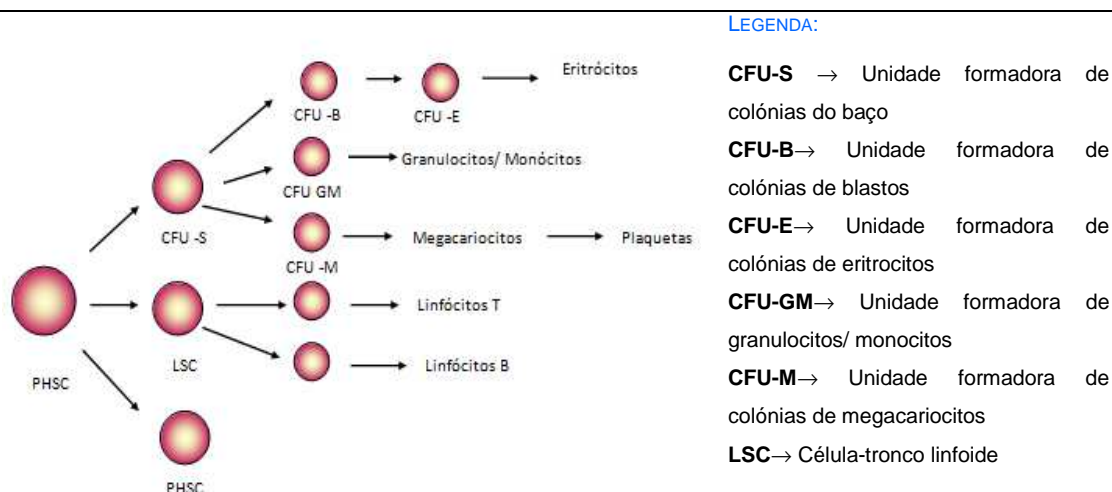


Figura 12 – Processo de formação das células sanguíneas

GLÓBULOS VERMELHOS (GV) OU ERITRÓCITOS

Os glóbulos vermelhos têm uma forma de disco bicôncavo, com a zona central mais corada que a periférica, perdem o núcleo durante a maturação, pelo que, quando em circulação, são anucleadas. O facto de possuírem uma considerável área interna “oca”, funcionam como um reservatório de hemoglobina. A forma bicôncava assegura

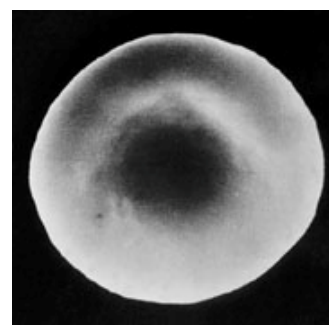


Figura 13 - Eritrócito

uma área maior para fenómenos de difusão.

A membrana celular é composta por uma dupla camada de fosfolípidos, colesterol, proteínas, mucopolissacáridos no exterior e espectina, na face interior.

As características da membrana e do interior da célula, permitem que esta sofra alterações (compactamentos e distensões) de forma a adaptar-se aos diferentes locais em que circula, em regiões de circulação estática ou muito lenta, os GV circulam em agregados de 2 a 12 células – rouleaux.

Duram cerca de 120 dias, devido à sua membrana que funciona como tanque circulante, que gira em torno dos componentes que transporta no seu interior.

Os glóbulos vermelhos podem apresentar variações na forma (poiquilocitose), no tamanho (anisocitose), na cor, e podem ter inclusões⁴.

GLÓBULOS BRANCOS OU LEUCÓCITOS

Os leucócitos têm origem numa célula comum – a Célula Tronco Pluripotente – e em duas unidades formadoras de colónias diferentes: de uma delas (CFU-S – Unidade formadora de colónias do baço) são originadas células que podem ser monócitos ou

qualquer um dos granulócitos, e da outra (LSC – Célula Tronco Linfoide) origina os linfócitos que serão do tipo T, caso sofram maturação no timo, ou do tipo B, caso a sua maturação se faça no Baço.

A granulopoiese faz-se pela seguinte ordem cronológica:

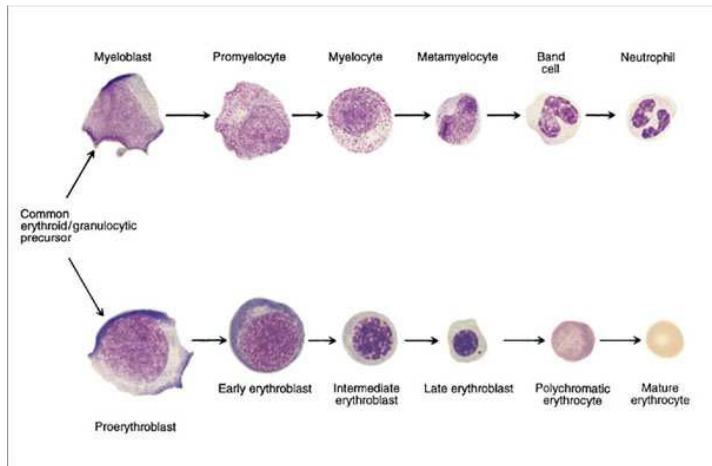


Figura 14 – Processo de Formação dos Leucócitos e dos Eritrócitos

Os leucócitos do sangue periférico normal podem ser classificados em leucócitos polimorfonucleares, granulócitos polimorfonucleares ou granulócitos (este termo inclui as células maduras e imaturas) e células mononucleadas.

Os leucócitos polimorfonucleares têm um núcleo lobulado, muito variável na forma e grânulos citoplasmáticos proeminentes, os quais diferem nas características tintoriais entre as três classes:

- 🔪 Neutrófilos
- 🔪 Eoinófilos
- 🔪 Basófilos

As células mononucleadas são:

- 🔪 Linfócitos
- 🔪 Monócitos

As células mononucleadas podem ter grânulos, que nos monócitos são inconspícuos, nos linfócitos podem ser proeminentes mas são pouco numerosos⁴.

🔪 Neutrófilos

Após total maturação, os neutrófilos passam do pool marginal para a circulação sanguínea, deslocando-se, aleatoriamente, para os tecidos e cavidades orgânicas, onde levam a cabo as suas principais funções.

Normalmente, os neutrófilos entram nos tecidos com a mesma taxa com que outros neutrófilos saem do pool marginal e entram na circulação periférica, onde têm um tempo de semivida de cerca de 5 dias.

Uma vez nos tecidos, os neutrófilos participam no combate a infecções ou são excretados pelo trato intestinal, pelo trato urinário, pulmões e glândulas salivares.

Também podem ser eliminados pelo sistema mononuclear fagocítico.

Os neutrófilos são metabolicamente ativos e são capazes de efetuar glicólise aeróbica e anaeróbica para obter energia.

A sua principal função é parar ou retardar a ação de antígenos (material estranho) ou de agentes infecciosos por intermédio de:

- Movimentação até à área de inflamação ou de infecção – diapedese;
- Fagocitose do material estranho – fagocitose;
- Digestão do material fagocitado.

Os neutrófilos são capazes de se movimentar, quer de forma aleatória- quimioquinese - quer de forma direcionada – quimiotaxis. Esta locomoção só é possível quando o neutrófilo está agarrado a uma superfície (veias...). Por emissão de pseudópodes, a célula consegue a típica movimentação.

São capazes de distinguir partículas estranhas de células danificadas – esta será a mais importante das suas funções fagocíticas.

Na presença de um processo inflamatório, os neutrófilos continuamente, movem-se para a área infetada, fagocitam o agente estranho, morrem e são, por sua vez, fagocitados pelos macrófagos.

São as 1^{as} células fagocíticas a chegar ao local da infecção, seguidos pelos monócitos.

Os ciclos de migração continuam até à extinção total dos antígenos.

Sob condições normais, os neutrófilos permanecem 4 a 5 dias nos tecidos antes da senescência (assincronismo nuclear) e destruição.

O neutrófilo maduro mede entre 12-15µm.

O citoplasma tem muitos grânulos finos distribuídos homogeneamente: os grânulos azurofilos (formados no promielócito) e em maior quantidade os grânulos específicos (formados no mielócito).

O núcleo tende a seguir uma forma, aproximadamente circular, tem a cromatina em *clumps* e este dividido entre 2 a 5 lobos distintos. A contagem média do número varia entre observadores com valores de 2,5 – 3,3 consoante os estudos.

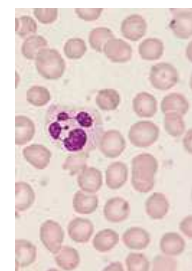


Figura 15 - Neutrófilo

A hipersegmentação dos neutrófilos – mais de 5% de neutrófilos com 5 ou mais lobos – é observada caracteristicamente na anemia megaloblástica e mais raramente em casos de anemia ferropénica, infeção, uremia ou nas síndromas mielodisplásicas.

A hiposegmentação dos neutrófilos pode ser observada nas síndromas mielodisplásicas (anomalia pseudo Pelger-Huet).

O bastonete é uma célula semelhante ao neutrófilo maduro mas sem lobos nucleares. Um aumento do número de bastonetes ocorre na gravidez e em situações patológicas como nas infeções⁴.

Eosinófilos






Os eosinófilos são, primariamente, células tecidulares.

Uma vez libertados para o sangue periférico, a partir da medula óssea, são rapidamente removidos, independentemente da sua idade, pelo que o seu tempo de semivida no sangue periférico é de apenas 8 horas.

Do sangue periférico são sequestrados para os tecidos onde se localizam, primariamente, em áreas expostas ao meio ambiente (pele, mucosa nasal, pulmões e trato gastro-intestinal).

São móveis e aptos para processos de locomoção celular semelhante ao dos neutrófilos, além de que são metabolicamente mais ativos do que estes últimos.

As suas funções não estão completamente compreendidas:

-  Fagocitam material estranho;
-  Fagocitam complexos Antígeno-Anticorpo;
-  São descritos como células anti-inflamatórias;
-  Parecem ter capital importância na defesa contra infeções parasitárias por helmintas (movem-se de imediato para o local de infeção);
-  Aderem às células infetadas e injetam-lhes enzimas hidrolíticas (contidas nos seus grânulos) que destroem o agente invasor.

O eosinófilo é ligeiramente superior em relação ao neutrófilo com um diâmetro de 12-17µm.

O núcleo é em geral bilobado, ocasionalmente trilobado.

O citoplasma é fracamente basófilo.

Os grânulos dos eosinófilos são esféricos e consideravelmente maiores que os grânulos dos neutrófilos; preenchem o citoplasma e coram de laranja avermelhado⁴.

Basófilos




Uma vez libertados da medula óssea, os basófilos permanecem na circulação, aproximadamente, o mesmo tempo que os neutrófilos, antes de migrarem para os tecidos.

Estão distribuídos por todo o organismo, incluindo, pele, parênquima pulmonar, timo, baço e medula óssea.

Possuem atividade fagocítica e quimiotática.

Os grânulos dos basófilos contêm serotonina, peroxidase, um componente histamínico vasoconstritor e heparina. Sintetizam um fator quimiotático dos eosinófilos, um fator ativador das plaquetas que promove a agregação plaquetária.

As suas funções são:

-  Intervêm no processo inflamatório;
-  Participam em respostas de hipersensibilidade tardias;
-  As suas membranas fixam imunoglobulinas do tipo IgE. Quando estes, por sua vez, se ligam a antígenos específicos, os basófilos libertam o conteúdo dos seus grânulos na área circundante, produzindo uma reação de choque anafilático.

O basófilo tem um tamanho semelhante ao do neutrófilo, 10-14 μm de diâmetro.

O núcleo, geralmente obscurecido por grânulos pretos/púrpura os quais têm um tamanho intermédio entre os grânulos dos neutrófilos e dos eosinófilos⁴.

Linfócitos

A génese dos linfócitos ocorre, por ordem de importância, nos seguintes locais:

1. Gânglios linfáticos;
2. Baço;
3. Timo (produção de linfócitos T desde a 8^a semana, até ao nascimento);
4. Amígdalas;
5. Placas de Peyer do intestino;
6. Diversos locais das mucosas do organismo;
7. Medula óssea (de forma excepcional).

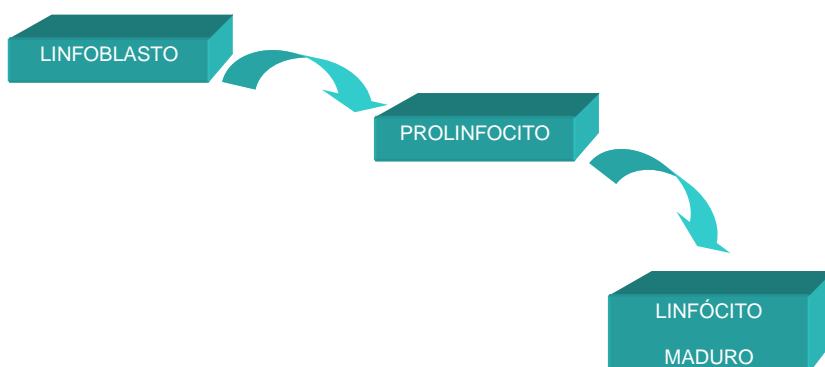


Figura 16 - Formação do Linfócito maduro

As células jovens da série linfoide (linfoblasto) distinguem-se das da série mieloide (mieloblasto) essencialmente por:

Mieloblasto > linfoblasto

Mieloblasto apresenta granulações características.

Citoplasma do linfoblasto é mais basófilo e menos evidente.

No linfoblasto, tanto a célula, como o respetivo núcleo são mais redondos do que o mieloblasto.

O linfócito varia entre 10-16 μm de diâmetro.

Os pequenos linfócitos, 10 a 12 μm , são predominantes, apresentam citoplasma escasso e um núcleo redondo ou ligeiramente indentado, com cromatina densa.

Os linfócitos maiores, 12 a 16 μm , constituem 10% dos linfócitos circulantes, têm citoplasma mais abundante e a cromatina nuclear menos condensada.

O citoplasma, fracamente basófilo, cora de azul pálido. Os linfócitos podem ter grânulos azurófilos em pequeno número.








Por vezes existem células maiores com citoplasma mais abundante e com grânulos – grandes linfócitos granulares (em indivíduos normais podem ocorrer até 10 a 15% mas em geral são menos frequentes).

Os linfócitos respondem a infeções virais e outros estímulos imunológicos através de um aumento do seu número e de alterações morfológicas evidentes⁴.

Monócitos

Originalmente, os monócitos e os macrófagos eram classificados como células do sistema reticuloendotelial. Atualmente pertencem ao sistema mononuclear fagocítico;

O seu desenvolvimento faz-se na medula óssea:

-  Célula-Tronco Pluripotente;
-  Célula Unipotencial;
-  Monoblasto;
-  Promonocito;
-  Monócito (medula óssea);
-  Monócito (sangue periférico);
-  Macrófago.

A diferenciação dos monócitos na medula óssea processa-se rapidamente (1.5 a 3 dias).

Processo controlado por um grupo de 11 fatores, 3 dos quais iniciam a diferenciação dos macrófagos a partir das células progenitoras uni e bi-pluripotenciais na medula óssea.

Os monócitos do sangue periférico são células jovens que possuem atividades:

- ✍ Migratórias;
- ✍ Quimiotáticas;
- ✍ Pinocíticas;
- ✍ Fagocíticas.

Possuem ainda recetores para IgG e alguns fatores do complemento.

Ao migrarem para os tecidos, os monócitos sofrem uma última diferenciação (que dura cerca de 1 dia) tornando-se macrófagos tissulares funcionantes.



Figura 17 - Macrófago

Os macrófagos podem dividir-se em macrófagos normais e macrófagos inflamatórios.

Os macrófagos normais incluem:

- ✍ Macrófagos dos tecidos conjuntivos (histiócitos);
- ✍ Hepáticos (células de Kupffer's);
- ✍ Pulmonares (macrófagos alveolares);
- ✍ Dos nódulos linfáticos;
- ✍ Esplénicos;
- ✍ Da medula óssea;
- ✍ De líquidos serosos (macrófagos pleurais e peritoneais);
- ✍ Da pele (histiócitos e células de Langerhan's);
- ✍ Outros tecidos.

A população de macrófagos num tecido em particular é mantida à custa de 3 mecanismos: recrutamento de monócitos do sangue periférico; proliferação local; reciclagem biológica.

Sob condições normais, a renovação da população de macrófagos tissulares ocorre através de proliferação local de células progenitoras e não por intermédio de recrutamento de monócitos do sangue periférico. Antes, pensava-se que os

macrófagos eram células de grande longevidade. Mais recentemente demonstrou-se que dependendo do tipo de tecido, a sua viabilidade varia entre os 6 e os 16 dias.

Os macrófagos inflamatórios

Os macrófagos inflamatórios estão presentes em vários exsudados e podem ser caracterizados através de vários marcadores específicos, e.g., atividade de peroxidases.

Em suma, os macrófagos são, genericamente, uma população de células mononucleares fagocíticas de distribuição ubíqua responsáveis por inúmeros processos homeostáticos, imunológicos e inflamatórios. A sua vasta distribuição tissular torna estas células adequadas para uma resposta de defesa imediata contra agentes estranhos, prévia à migração dos outros leucócitos.

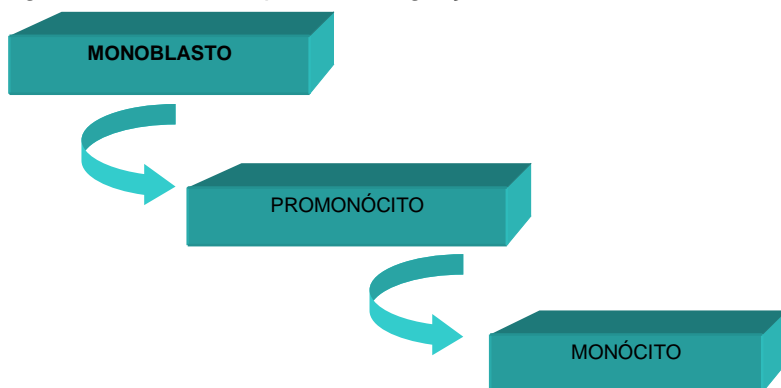


Figura 18 - Formação dos monócitos

Os monócitos que saem da circulação para os tecidos e se tornam macrófagos não voltam ao sangue periférico.

O monócito é a maior célula normal do sangue periférico com um diâmetro de 12 – 20 μm . Tem um núcleo irregular, frequentemente lobulado e o citoplasma é azul acinzentado com grânulos azurófilos muito finos.

O contorno da célula é frequentemente irregular e o citoplasma pode apresentar vacúolos⁴.

PLAQUETAS

A plaqueta sanguínea ou trombócito é um fragmento anucleado dos megacariócitos. Mede entre 1,5 e 3,0 micrómeros de diâmetro e circulam no sangue com o formato de disco achatado quando não estão estimuladas. Quando estimuladas, as plaquetas podem atuar na coagulação sanguínea das formas física (quando a sua estrutura celular interage fisicamente com algumas fibras para fim de diminuição da hemorragia)

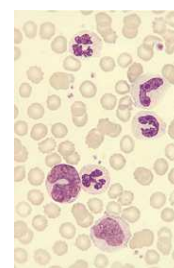


Figura 19 - Monócitos

e química (quando há liberação de fatores de coagulação, por exemplo). Ela é responsável pela coagulação do sangue.

As plaquetas contêm RNA, mitocôndria, um sistema canicular, e vários tipos de grânulos; lisossomas (contendo ácido hidrótico), corpos densos (contendo ADP, ATP, serotonina, histamina, e cálcio) e alfa grânulos (contendo fibrinogênio, fator V, vitronectina, trombospondina e fator de von Willebrand) ⁴.

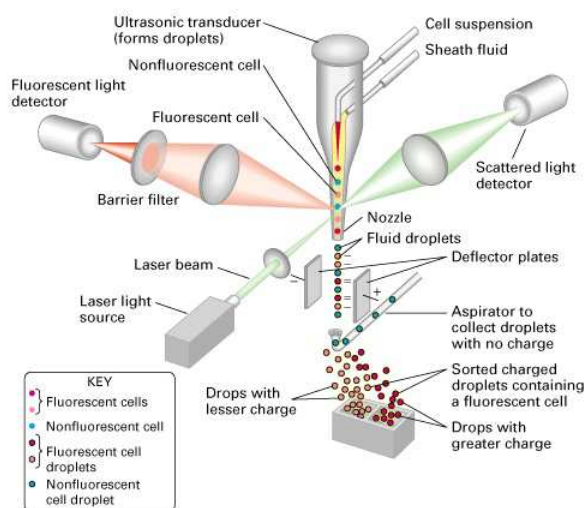
CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é um método rápido, objetivo, quantitativo e reprodutível que permite a determinação de múltiplas propriedades físicas, simultaneamente de partículas isoladas em suspensão, como as células.

Este método consiste em: Irradiação por luz laser, fluxo de células e detecção de luz dispersa e fluorescente.

A citometria de fluxo mede as propriedades de células em suspensão num meio fluido em movimento, orientadas num fluxo laminar e intercetadas uma a uma por um feixe de luz laser. As células passam pelo laser a uma velocidade de mais de 5.000 células por segundo. As modificações ocasionadas nesse feixe de luz devidas à presença da célula serão então detetadas e medidas por sensores. A luz dispersa é coletada por um sistema ótico que permite identificar as células pelo seu tamanho e granulosidade interna.

Um raio laser é focado através de uma lente cilíndrica para formar um raio elíptico que



irradia um fluxo de células num feixe. A técnica do fluxo de células está concebida para que elas fluam para o centro do feixe, eliminando a necessidade de voltar a focar cada uma das células. À medida que as células passam pelo feixe de laser, a luz difunde-se e as células fluorescem. Esta luz difusa e fluorescente é detetada por um foto díodo e por um

Figura 20 – Esquema da Citometria de Fluxo

foto multiplicador, respetivamente. Através

deste procedimento, a citometria de fluxo mede a luz difusa e a luz fluorescente para cada célula que flui no feixe. A informação fornecida pela luz difusa e fluorescente varia, dependendo das condições analíticas e das características dos fluorocromos e por isso este processo requer um alinhamento e estabilidade ótica precisos.



Os diferentes fluorocromos que marcam cada antigénio absorvem a luz e emitem-na num comprimento de onda maior e específico. Os fotões de luz gerados atingem detetores específicos e são convertidos em impulsos elétricos proporcionais ao número de fotões recebidos. Estes impulsos são convertidos em sinais digitais, podendo oferecer os resultados em diferentes formas de análise tais como histogramas, *dot-plot*, tabelas, entre outros¹⁰.

CONTAGEM E DIFERENCIAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE GLÓBULOS BRANCOS

É feita uma medição fluorescente que mostra a relação nucleoplasma de cada célula individualmente. A combinação da complexidade interna da célula, do volume e da fluorescência do material ácido nucleico determina a classificação de cada população. Esta medição tridimensional permite um diferencial exato e preciso, mesmo em amostras altamente patológicas. Os leucócitos analisados compreendem os Basófilos, os Eosinófilos, os Linfócitos, os Monócitos e os Neutrófilos¹¹.

CONTAGEM DE GLÓBULOS VERMELHOS E PLAQUETAS

São contados num canal próprio pelo método de deteção de corrente contínua e focagem hidrodinâmica para minimizar coincidências ou recirculação. Contêm discriminadores que separam as duas populações com base em logaritmos complexos¹¹.

ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS

São usados para definir o tamanho e o conteúdo de hemoglobina existente no glóbulo vermelho. Estes índices são muito úteis para diferenciar anemias.

No analisador são efetuados os cálculos necessários para obtenção dos resultados.

O analisador executa o cálculo direto dos parâmetros, RBC, WBC, PLT e HGB.

A **Hemoglobina** é medida diretamente pelo método lauril sulfato de sódio. A hemoglobina é determinada num canal separado, minimizando a interferência de grandes concentrações de leucócitos. Este método demonstra uma excelente correlação com o método de referência.

O **Volume Globular Médio** (MCV) e o **Volume Plaquetário Médio** (MPV) são dados por cálculo semidireto (direto através do histograma).

Há ainda cálculos que se obtém automaticamente, como sendo:

Hematócrito (HCT) – calculado a partir do VGM que o aparelho mede diretamente, com base na contagem e deteção do volume de cada glóbulo vermelho.

Hemoglobina Globular Média (MCH) – obtida pela divisão do resultado da dosagem de hemoglobina pelo número de GV e indica o peso médio da hemoglobina por glóbulo. Depende ao mesmo tempo do conteúdo de hemoglobina por unidade de volume e volume globular, sendo que:

$$\text{MCH (pg/GV)} = \frac{\text{Hb (g/dL)}}{\text{GV (milhões/ } \mu\text{L)}} \times 10$$

Concentração média de hemoglobina celular (MCHC) – obtido pela divisão do resultado da dosagem da hemoglobina pelo hematócrito. Dessa forma considera-se a quantidade de hemoglobina por unidade de volume de GV.

$$\text{MCHC (g/dl)} = \frac{\text{Hb (d/dl)}}{\text{Hematócrito (\%)}} \times 100$$

Os scattergramas permitem ainda saber:

Coeficiente de Variação do Tamanho dos GV (RDW)

Coeficiente de Variação do Tamanho das Plaquetas (PDW)⁴.

A **Diferenciação de populações celulares** é feita por citometria de fluxo fluorescente, usando corantes fluorescentes altamente específicos¹¹.

SYSMEX CA 500

O equipamento SISMEX CA 500 é um aparelho automatizado, utilizado na avaliação da coagulação sanguínea, onde são determinados, a Taxa de Protrombina (TP), a Razão Normalizada Internacional (INR), o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (APTT) e o Fibrinogénio.

Os métodos utilizados são: método de deteção de luz difusa e método



Figura 21 - SISMEX CA 500

colorimétrico. Para esta determinação é necessário sangue colhido em citrato de sódio na proporção 1/10¹¹.



COAGULAÇÃO

A coagulação plasmática designada, mais simplesmente, por coagulação, conduz à transformação do fibrinogénio insolúvel, em fibrina solúvel.

Na realidade, a hemóstase primária e a coagulação começam, praticamente, ao mesmo tempo e estão interligadas.

A ativação da coagulação é desencadeada *in vivo* pelas lesões que expõem o subendotélio ao sangue e também, pelas feridas dos tecidos, as quais introduzem na circulação uma substância procoagulante, o fator tecidual (tromboplastina).

Na coagulação intervêm vasos, plaquetas e fatores plasmáticos da coagulação. Neste mecanismo, os proenzimas dão origem a enzimas e todo o processo de ativação desenvolve-se através de interações moleculares, de modo a que o fenómeno se potencialize (tais reações são moduladas por inibidores fisiológicos). Esta sequência de acontecimentos, levou a que fossem comparados com uma cascata, daí que os diagramas que os representam sejam designados por cascata da coagulação.

A ativação da coagulação pode ser feita pela via intrínseca por contacto do sangue com uma superfície carregada negativamente (subendotélio, *in vivo*, vidro ou caolina, *in vitro*) ou pela via extrínseca, devido à introdução de fator tecidual no sangue.

As duas vias conduzem à conversão do fator X em Xa (início da via comum), que provoca a formação de trombina que, por sua vez, transforma o fibrinogénio em fibrina.

A via intrínseca (ou fase de contacto) é desencadeada pela fixação dos fatores XI e XII, pré-caliceína e Quininogénio de Alto Peso Molecular (HMWK) sobre toda a superfície eletronegativa. *In vivo*, esta superfície pode ser constituída por plaquetas agregadas. O fator XIIa transforma, por cisão proteolítica, o XI em XIa, e a precaliceína em caliceína. Há ativação recíproca entre estes dois fatores.

O fator XIa, em presença do cálcio (Ca^{2+}) ativa o IX por proteólise.

O IXa vai ativar o X, graças a um complexo formado pelo IXa, o VIIIa, o Ca^{2+} e uma superfície fosfolípídica (da membrana da célula endotelial).

Na via extrínseca primeiro dá-se a interação entre o VII e o fator tecidual em presença do Ca^{2+} , seguido de proteólise do VII. O fator VIIa ativa o X, e o contrário.

Na via comum ocorre a ativação do fator II (protrombina), a qual se faz graças a um complexo chamado protrombinase (que inclui o Xa, o V, o Ca^{2+} e fosfolípidos, sejam plaquetares ou endoteliais).

Os fatores II, Xa e V fixam-se sobre os fosfolípidos.

O fator Xa transforma o II em IIa (trombina). Esta ataca as regiões terminais aminadas do fibrinogénio, libertando 2 moléculas de fibrinopéptido A e 2 de fibrinopéptido B. O

fibrinogénio transforma-se em monómeros de fibrina, que se agregam espontaneamente entre eles, resultando num polímero de fibrina solúvel que é estabilizado pelo XIII, previamente ativado pela trombina.

Os fatores XIIa e o IXa podem ativar o VII, que por sua vez ativa o IX⁴.

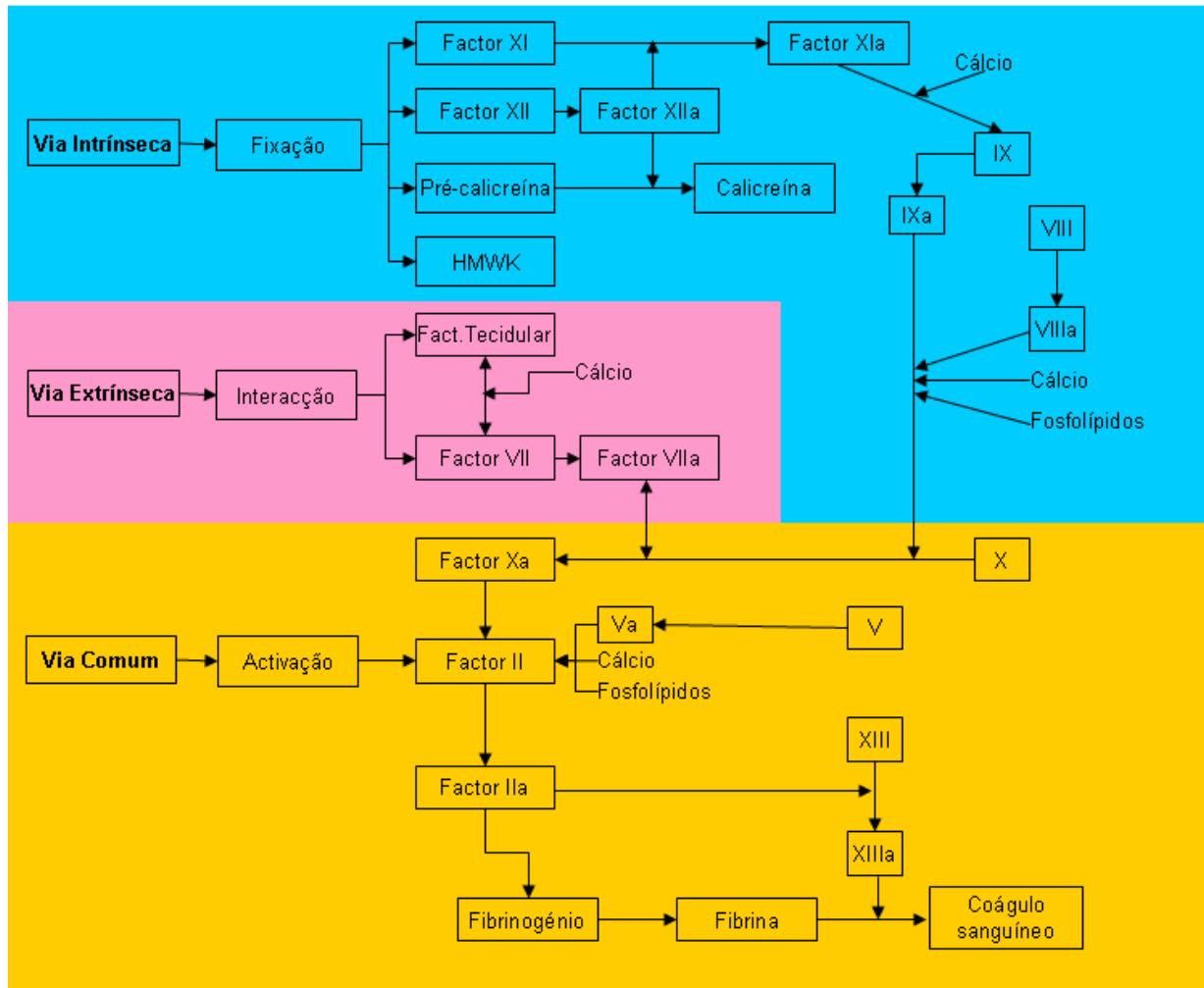


Figura 22 – Cascata da Coagulação

Fibrinólise

A Fibrinólise é o processo de destruição do coágulo através de um sistema de enzimas que lisam a fibrina, dissolvendo o coágulo.

A Fibrinólise é mediada pela formação de um enzima proteolítico – Plasmina, através da ativação do plasminogénio.

Durante a coagulação, o plasminogénio e a trombina ficam enredados no trombo formado. O Plasminogénio é ativado pelo Ativador Tecidual do Plasminogénio (TPA) e forma-se a plasmina.

A lise química da fibrina pela plasmina resulta na produção de fragmentos chamados Produtos de Degradação da Fibrina (PDF). A Plasmina atua sobre estes fragmentos para formar PDF cada vez menores. Os produtos finais são eliminados pelo sistema retículo-endotelial⁴.

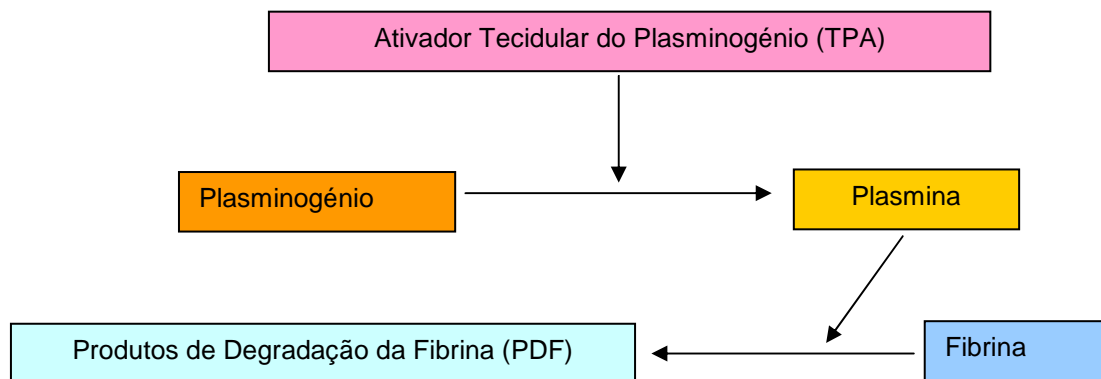


Figura 23 – Fibrinólise

TEMPO DE TROMBOPLASTINA (TP)

O TP é o tempo de coagulação de um plasma citratado em presença de um excesso de tromboplastina tecidual e de Ca^{2+} . Determina-se o tempo desde a junção do reagente (tromboplastina tecidual e Ca^{2+}) até à formação do coágulo.

Este teste avalia a via extrínseca da cascata da coagulação e é utilizado na monitorização da anticoagulação oral;

Permite avaliar a função hepática pois é muito sensível ao fator VII que é sintetizado no fígado, sendo o primeiro a desaparecer e o primeiro a reaparecer⁴.

O TP mede o tempo que o coágulo de fibrina demorou a formar, através de um processo de incubação do plasma com um excesso de tromboplastina tecidual e cálcio. Os valores normais podem ser dados em segundos (10,3 – 13,0 seg.), percentagem (70 – 140%) ou em INR, a razão normalizada internacional (0,9 – 1,0).

O aparelho que realiza os testes, faz os cálculos e dá o resultado.

A apresentação dos resultados para o TP pode ser dada em percentagem ou em Razão Normalizada Internacional (INR).

Os resultados em percentagem são obtidos por comparação do resultado obtido em segundos com uma curva de calibração previamente executada e inserida no coagulómetro. Para fazer a curva de calibração é utilizado um plasma padrão obtido através de um pool de plasmas de indivíduos sem patologias e que não estejam a tomar anticoagulantes orais.



Uma vez que antigamente havia discrepâncias entre laboratórios na apresentação dos resultados do TP para os doentes com terapêutica anticoagulante, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs que as tromboplastinas fossem padronizadas segundo uma preparação de referência internacional e criou o Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) que é característico da tromboplastina usada e é indicado pela casa comercial (resulta da comparação da sua sensibilidade com a de uma tromboplastina padrão internacional). Assim, os resultados podem ser referenciados como Razão Normalizada Internacional (INR), que é na prática a razão entre o TP da amostra (T_a) e o TP de um plasma normal (T_c) elevada a um fator ISI.

TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (APTT)

O APTT é o tempo de coagulação de um plasma citratado em presença de Ca^{2+} , um ótimo de fosfolípidos (Cefalia) e um ativador dos fatores de contacto (caulina, sílica e ácido elágico). Determina-se o tempo desde a junção Ca^{2+} até à formação do coágulo.

O APTT é determinado fundamentalmente pelos seguintes componentes: FXII, FXI, FVIII, FIX, FX, FV, protrombina e fibrinogénio.

O APTT é um teste geral de rastreio que avalia a via intrínseca da cascata da coagulação (fatores VIII, IX, X, XI, XII, I e II) exceto as plaquetas. A sua principal aplicação é a deteção de deficiências congénitas e adquiridas destes fatores, assim como a monitorização da heparinoterapia⁴.

Este sistema de coagulação é iniciado pela adição de cloreto de cálcio¹¹.

FIBRINOGENIO

O fibrinogénio é uma glicoproteína presente no plasma numa concentração de 2 a 4 g/L. É sintetizado no fígado (1,7 a 5 g/dia) e nos megacariócitos e tem um tempo de semivida de cerca de 3 -5 dias.

O doseamento do fibrinogénio é um teste para determinação quantitativa in vitro dos níveis de fibrinogénio em plasma citratado.

A transformação do fibrinogénio em fibrina é induzida por adição de uma solução de trombina cálcica em excesso. A concentração de fibrinogénio é diretamente proporcional ao tempo de coagulação⁴.

Este equipamento dá o valor de fibrinogénio através de um cálculo interno do equipamento¹¹.

ADAMS A1C HA8160

O equipamento ADAMS A1C HA8160 é um analisador automático de glico-hemoglobina. Este aparelho efetua a medição da hemoglobina A_{1c} e fornece as informações necessárias para o controlo do açúcar no sangue das pessoas diabéticas, ou seja, é útil para monitorizar a longo prazo as os diabéticos¹¹.



Figura 24 - ADAMS A1C HA8160

A hemoglobina glicosilada é formada por reações não enzimáticas entre a

hemoglobina e a glicose. A formação desta hemoglobina é irreversível, e a sua concentração sanguínea depende da vida média dos glóbulos vermelhos (120 dias) e da concentração sérica de glicose. Este equipamento pode também medir a HbA₁, HbF estáveis e padrões fracionados.

O doseamento destas hemoglobinas é feito por Cromatografia Líquida de Alta Pressão, que usa uma coluna composta por resina de troca iónica de carácter catiónico de fase reversa. A leitura das frações obtidas é realizada a 415 nm e 500 nm. Podendo assim obter-se as seguintes frações: HbA_{1c}, HbA₁, HbF, HbA₂ e hemoglobinas variantes. Este aparelho é capaz de diluir, hemolisar e remover a base de Schiff (resultado da reação responsável pela formação da hemoglobina glicosilada) automaticamente. Esta remoção é feita com tetrapolifosfato (pH 6,0) durante 2 minutos a 48°C. Após 4,2 minutos obtêm-se o cromatograma.

Os valores normais da hemoglobina glicosilada são entre 4% a 6%. Quando está acima de 7% existe a associação a um risco maior de complicações crónicas¹¹.

CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESSÃO

O uso de pressões elevadas permite uma redução no diâmetro das partículas da fase estacionária, localizada no interior da coluna cromatográfica, o que promove uma separação mais eficiente dos componentes da amostra. Essa "miniaturização" das partículas da coluna permite o uso de colunas menores, volumes menores de

amostras e um gasto menor de fase móvel. Assim sendo, em cromatografia líquida de alta pressão trabalha na faixa dos microlitros (μL).

VESMATIC 30/30 PLUS

Este equipamento automático é utilizado na determinação da velocidade de sedimentação globular.

Este analisador foi concebido para a determinação simultânea da Velocidade de Sedimentação Globular (VSG) em 30 amostras de sangue (humano ou animal). A determinação da VSG é automática mas os resultados são comparáveis aos obtidos pelo método



Figura 25 - VESMATIC 30/30 PLUS

de Westergren (método referência). Permite obter resultados em 25 minutos incluindo a homogeneização da amostra. Com a utilização de ciclos rápidos, o tempo de análise pode ser reduzido para 10 minutos e 15 minutos para a primeira e segunda hora respetivamente¹¹.

VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO GLOBULAR

É a velocidade a que sedimentam os eritrócitos, num sangue anticoagulado, num determinado espaço de tempo, quando introduzida a amostra em tubos ou pipetas com características especiais.

Quando uma amostra de sangue anticoagulado fica em repouso, os eritrócitos vão-se aproximando uns dos outros e agregam-se, formando estruturas cilíndricas semelhantes a pilhas de moedas. A este fenómeno dá-se o nome de Fenómeno de Rouleaux.

Se, durante o tempo estabelecido para a sedimentação, realizarmos leituras em curtos intervalos de tempo, consegue-se verificar que o fenómeno de sedimentação ocorre através de uma curva: numa primeira fase a VS é muito lenta (formação dos agregados), na fase intermédia verifica-se uma sedimentação rápida ("descida" dos empilhamentos) e a fase final é, novamente, mais lenta (compressão das formações de Rouleaux).

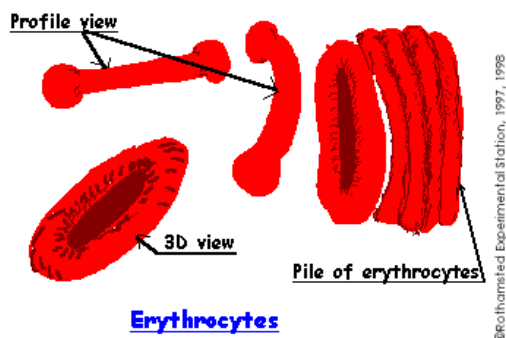


Figura 26– Fenómeno de Rouleux

Assim quanto mais comprido for o tubo, mais tempo o segundo período pode durar e maior a VS pode ser, é o que acontece no método de Westergren. Com o tubo mais pequeno, como no método de Wintrobe, quando os rouleaux sedimentam rapidamente a formação do “pack” pode começar antes da hora o que torna o método pouco sensível para velocidades de sedimentação elevadas, o contrário acontece com o método de Westergren. Por isso, e por ser de relativa fácil execução, é o método adotado internacionalmente.

A amostra primordial para este teste é sangue total anticoagulado com citrato de sódio 1/5. O teste deve ser efetuado nas 2 horas após a colheita do sangue, ou 6 horas se o sangue for mantido a 4°C⁴.

IMPORTÂNCIA CLÍNICA:

A VS representa a fase de resposta aguda a um estado inflamatório. Este valor é medido num período de tempo específico e é bastante influenciado pela concentração de algumas proteínas, cuja concentração plasmática varia na presença de processos inflamatórios ou outras patologias. O valor é também afetado por algumas propriedades dos eritrócitos e por anemia.

Valores elevados são também encontrados em situações como: mieloma múltiplo, leucemia, linfomas, cancro da mama e pulmão, artrite reumatoide, falha pulmonar. Os valores são também bastante elevados na presença de metástases no fígado, e doenças inflamatórias agudas e crónicas⁴.

HB GOLD

O HbGold é um equipamento automático destinado ao ensaio de frações de hemoglobina (HbA1c, HbA2, HbF, HbE, HbD, HbS e HbC), através de cromatografia de troca de catiões em baixa pressão, em conjunto com um gradiente de força iónica, para eluir os



Figura 27 – HB GOLD

subtipos e variantes da hemoglobina humana de sangue total hemolisado. As frações de hemoglobina separadas são monitorizadas através da absorção de luz a 415nm.

O cromatograma obtido é gravado e armazenado pelo computador interno. Um programa de software analisa o cromatograma e gera um relatório de resultados no ecrã e na impressora.

Este aparelho vai permitir o doseamento das hemoglobinas F, A2, e de hemoglobinas variantes como hemoglobina S, C¹¹.

A técnica HB-Gold é utilizada em doentes em que tenha sido detetada uma anemia microcítica e hipocrómica, através de uma determinação do hemograma, de forma a comprovar a presença ou ausência de hemoglobinopatias, isto é, para verificar a existência de uma possível afeção que se traduz numa alteração da hemoglobina. Num paciente com HbA2 aumentada ($\alpha\beta$ - talassémia) e/ou que apresenta HbS faz-se um estudo pormenorizado.

As manifestações clínicas das hemoglobinopatias variam muito de acordo com o tipo de problema apresentado. As crianças com anemia falciforme (assim denominada devido aos glóbulos vermelhos apresentam uma forma de foice) produzem hemoglobina S em vez da hemoglobina A normal, sendo altamente suscetíveis à anemia hemolítica, por rutura dos glóbulos vermelhos e a infeções que podem levar à sépsis (infeção generalizada do sangue). As obstruções em pequenos vasos causam dor e comprometem progressivamente a função de alguns órgãos e tecidos. As alterações nas hemácias afetam também o baço, que aumenta muito de tamanho e contribui ainda mais para a anemia. As talassémias, caracterizadas por deficiente produção de hemoglobina, são marcadas clinicamente pela presença de anemia.

A anemia falciforme é bastante comum em negros, estima-se que o gene esteja presente em 6 a 10% dos negros americanos, o que leva a doença a ocorrer em 1 para cada 400 a 1000 nascimentos nesse grupo populacional. As talassémias são

mais frequentes em populações descendentes de grupos originários do Mediterrâneo. Em seu conjunto, estima-se que 5% de toda população mundial seja portadora de algum distúrbio de hemoglobina.

Em 95% dos casos as hemoglobinas anormais diferem nas normais num aminoácido que foi substituído por outro. Isto leva a que as hemoglobinas possuam propriedades distintas de solubilidade, de afinidade para o O₂, carga elétrica, entre outras coisas⁴.

Resultados

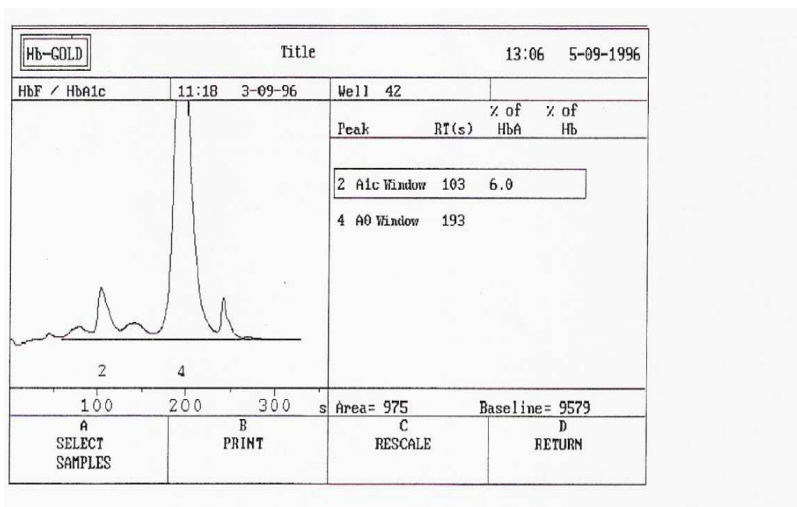


Figura 28 – Exemplo de um gráfico normal

Este gráfico é típico de um paciente normal, cada pico do gráfico corresponde à quantidade de hemoglobina na amostra. Quanto maior for o pico mais concentração da respetiva hemoglobina existe na amostra.

CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

O reticulócito corresponde ao estágio de maturação do glóbulo vermelho que acaba logo que a célula está madura, ou seja, quando o glóbulo vermelho adquire a forma bicôncava e não contém nenhum organelo. São glóbulos vermelhos policromatófilos, que apresentam uma estrutura reticular de RNA quando corados por um corante vital (denomina-se coloração supravital, uma vez que cora a célula viva). A contagem de reticulócitos no sangue periférico reflete a atividade eritropoiética.

Os reticulócitos encontram-se aumentados nas anemias hemolíticas, anemia por hemorragia aguda, boa resposta terapêutica na anemia megaloblástica e anemia ferropénica. Os reticulócitos encontram-se diminuídos na anemia aplástica, ferropénica, megaloblástica, sideroblástica, anemia da doença crónica, anemia da insuficiência renal, anemia da doença hepática.



A técnica da coloração supravital utiliza o corante Azul Cresil Brillhante. A contagem é feita posteriormente no microscópio ótico¹³.

CONTAGEM DE PLAQUETAS (CÂMARA DE PLAQUETAS)

As plaquetas, também chamadas Trombócitos, têm uma função essencial nos processos de hemóstase e coagulação do sangue. Na realidade não são células; são corpúsculos ou fragmentos de uma célula maior chamada megacariócito (célula de um tamanho considerável residente na medula óssea, e a sua fragmentação origina então as plaquetas que são lançadas na circulação). Estas têm a forma de minúsculos discos arredondados, sem núcleo. A superfície externa das plaquetas é carregada com cargas elétricas negativas semelhantes às do endotélio vascular.

Quando é necessário a confirmação do valor de plaquetas dado pelo aparelho automático, realiza-se a contagem das mesmas em câmara de Neubauer, após a mistura de 10 µl de sangue total com 190 µl de solução de oxalato de amónio 1%. A contagem é feita posteriormente no microscópio ótico¹³.

CRIOAGLUTININAS

As crioaglutininas são anticorpos IgM dirigidos contra o antígeno I da membrana eritrocitária, e assim são capazes de aglutinar hemácias humanas a baixas temperaturas. Parte-se do princípio que estas podem ser formadas após exposição a microrganismos que apresentam grupos antigénicos semelhantes aos encontrados nas hemácias. Em condições normais necessitam de refrigeração para que ocorra a reação com as hemácias. Apresentam-se elevadas em diferentes situações, como nas infeções por *Mycoplasma pneumoniae*, vírus influenza, mononucleose infecciosa, doença do colagénio, artrite reumatoide e linfomas. Esta técnica é mais utilizada para o diagnóstico de infeções por *Mycoplasma pneumoniae*. Títulos altos podem raramente aglutinar as hemácias. Em temperaturas próximas da temperatura normal do corpo humano podem levar à anemia hemolítica. Pode também interferir na determinação do grupo sanguíneo e nas transfusões sanguíneas.

Método das crioaglutininas:

- 1- Num tubo de vidro grande coloca-se o sangue com anticoagulante citrato de sódio 1/5, e centrifuga-se 2 minutos a 3000 rpm. Depois de centrifugado, retira-se o plasma e coloca-se mais ou menos a mesma quantidade de soro de forma a lavar os glóbulos, realizam-se pelo menos 3 lavagens dos glóbulos;
- 2- Depois utilizam-se 5 tubos pequenos, 1 tubo controlo (não se coloca soro do doente) e 4 tubos para as diluições (em todos os tubos se coloca 500µl do soro

fisiológico). No primeiro tubo coloca-se 500µl do soro do doente. Homogeniza-se com a pipeta e fazem-se diluições seriadas, em que no último tubo os restantes 500µl são rejeitados;

3- Da lavagem dos glóbulos prepara-se a solução das hemácias: 10 mL soro fisiológico + 50µl das hemácias. Depois coloca-se 500µl desta solução das hemácias em cada tubo, incluindo o tubo controlo;

4- Por fim colocam-se todos os tubos tapados no frigorífico, e no dia seguinte verifica-se se há aglutinação ou não¹³.

CRIOGLOBULINAS

As crioglobulinas são proteínas séricas precipitam a baixas temperaturas (4°C) e se redissolvem após serem aquecidas. A sua presença no sangue (crioglobulinémia) é usualmente associada com doença imunológica, mas pode também ocorrer sem que haja imunopatologia conhecida. Se os pacientes com crioglobulinémia forem submetidos ao frio, eles podem sentir sintomas semelhantes ao da doença de Raynaud (dor, cianose e frieza de dedos), que tipicamente resultam de precipitação de crioglobulinas em partes mais frias do corpo.

A técnica utilizada consiste apenas em colocar em simultâneo um tubo do soro do doente na estufa e outro no frigorífico e avaliar a presença ou ausência de aglutinações no tubo que se encontra no frigorífico, durante 7 dias¹³.

TIPAGEM SANGUÍNEA – SISTEMA AB0 e Rh

O sistema AB0 foi o primeiro a ser descoberto e é também o mais importante para a prática transfusional. Os antigénios que pertencem ao sistema AB0, estão presentes nas membranas dos eritrócitos, células epiteliais e endoteliais, estão também presentes na forma solúvel no plasma e noutros líquidos orgânicos. Existem quatro grupos sanguíneos: A, B, AB e 0 (ausência de antigénios A e B).

Quando se refere que um indivíduo é Rh Positivo, significa que tem o antigénio D. Após os antígenos A e B (do sistema AB0), o antígeno D é o mais importante na prática transfusional.

A tipagem AB0 e Rh feita no laboratório consiste na utilização de antissoros específicos, Anti-A, Anti-B, Anti-A+B MONOCLONAL e Anti-D MONOCLONAL.

A presença de aglutinação direta determina a presença do respetivo antigénio presente e assim determina o grupo sanguíneo.



Quando não há aglutinação com o soro anti-D o sangue em causa é enviado para o laboratório externo, para confirmação, atendendo à probabilidade de existência de antígenos D de fraca expressão¹³.

ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS E COLORAÇÃO DE MAY-GRÜNWARD-GIEMSA

Para ser considerado um bom esfregaço este deve ter entre 3 a 4 cm de comprimento, ter bordos visíveis e retilíneos, deve ser regular (sem travagens), relativamente fino, sem buracos (originados pelo facto da lâmina estar engordurada) e por fim deve terminar arredondado apresentando cabeça, corpo e cauda. Quanto mais rápido for o movimento para espalhar a gota de sangue, mais liso e espesso será o esfregaço.

Sempre que se verifica a necessidade de confirmar alguma informação dada pelo equipamento automático sobre os glóbulos brancos, vermelhos e seus percursores realiza-se a coloração do esfregaço do sangue respetivo e visualiza-se ao microscópio ótico.

A coloração utilizada é a de May-Grünwald-Giemsa: Esta coloração é uma combinação das colorações de Grünwald e de Giemsa. É uma combinação de dois corantes que contêm eosina e derivados do azul-de-metileno.

O resultado final desta coloração é: os núcleos dos leucócitos aparecem de cor azul-pálido, o citoplasma a azul muito claro ou incolor, as granulações neutrófilas a vermelho-claro, os basófilos a azul-escuro e os eosinófilos a vermelho alaranjado¹³.

PESQUISA DE CÉLULAS FALCIFORMES

A pesquisa de células falciformes é útil no despiste da drepanocitose, uma deficiência na estrutura da hemoglobina que leva a formação de células falciformes. Esta doença é característica da população Africana, mas pode ser também encontrada noutras populações. A forma homocigótica da drepanocitose (HbSS) causa anemia hemolítica moderada a severa. Está associada a episódios de oclusão vascular resultando em crises agudas e eventualmente em danos graves nos órgãos. O estado heterocigótico (HbAS) é muito comum em todo o mundo não estando associado a anomalias hemolíticas graves. Para a deteção da presença de HbS faz-se uma eletroforese das hemoglobinas, e se estiver presente hemoglobina S segue-se para o passo seguinte que consiste na diminuição da solubilidade da hemoglobina e baixas tensões de oxigénio, que se executa da seguinte forma: numa lâmina coloca-se uma gota de sangue e uma gota de soro fisiológico, mistura-se e cobre-se com uma lamela. De seguida comprimir a lamela para que saia um pouco de sangue pelos lados da mesma



e recolhe-se esse excesso com papel de filtro. Depois cobrem-se os bordos da lamela com parafina líquida ou cera e deixa-se solidificar. Esperar 6 a 24 horas e observar ao microscópio ótico¹³.

TEMPO DE HEMORRAGIA- MÉTODO DE DUKE

O tempo de hemorragia é o teste mais básico para o estudo da coagulação sanguínea, usado no diagnóstico das doenças hemorrágicas e como exame pré-operatório. Baseia-se no método de Duke, em que é feita uma pequena incisão no lóbulo da orelha com uma lanceta, e depois com um papel de filtro vai se limpando o sangue de 30 em 30 segundos até a hemorragia parar, e é medido o tempo de hemorragia. A cessação da hemorragia deve ser antes dos 2 – 3 minutos, e indica a formação do coágulo que é dependente do número de plaquetas e da sua capacidade de adesão ao endotélio e formação de agregados¹³.

TEMPO DE COAGULAÇÃO

É o tempo que decorre desde que o sangue é colhido até à formação do coágulo. Mede-se com o sangue colocado num tubo de vidro com 9 mm de diâmetro aproximadamente. O tubo é colocado em banho-maria a 37°C alguns minutos, e durante esses minutos o tubo vai sendo retirado do banho-maria a cada 30 segundos, até que se veja que o sangue coagulou e já não se move nas paredes do tubo. O tempo de coagulação normal é de 5 a 10 minutos, podendo considerar-se 7 minutos o tempo médio¹³.

CONTROLO DE QUALIDADE

Entende-se por controlo de qualidade interno, o conjunto de procedimentos postos em prática num laboratório com vista a permitir um controlo da qualidade dos resultados das análises à medida que as mesmas são executadas, usando dados obtidos pela análise de produtos de controlo de qualidade. O controlo de qualidade permite trabalhar com fiabilidade, permite saber se os resultados obtidos são de facto reais.

Os Objetivos do Controle de Qualidade são fornecer um contínuo registo da precisão dos resultados laboratoriais, fornecer aviso precoce quanto às tendências e desvios nos resultados do controlo, de modo que se possa tomar uma ação corretiva antes que os resultados deixem de ser precisos, permitir avaliar a fidelidade dos resultados, pela monitorização da precisão, através da comparação dos resultados da amostra controle com os valores pré-estabelecidos, permitir comparações entre diferentes técnicas e a monitorização do desempenho dos analisadores automáticos

Um produto de CQ é um material semelhante ao do paciente, preparado a partir de soro humano ou de urina. Pode ser liofilizado ou líquido e é composto por um ou mais constituintes (analitos) de concentração conhecida. Geralmente utilizam-se dois ou três níveis de controlo, sendo um deles com valores semelhantes aos valores normais e os outros dois para valores patológicos.

Para a avaliação dos resultados do controlo de qualidade é importante a aplicação e conhecimento das Cartas de Controlo de Levey-Jennings.

A calibração é fundamental no laboratório de análises clínicas, consiste num ajuste aos valores reais do que estamos a analisar e é obtida uma reta de calibração para leitura dos resultados.

É fundamental calibrar sempre que se muda o lote de reagente, ou quando os valores de controlo de qualidade não estão adequados aos valores que esperamos.

Cartas de Controlo de Levey-Jennings

O Desvio Padrão (DP) é utilizado para elaborar as cartas de Levey-Jennings (LJ), estas cartas são utilizadas para monitorizar os valores do CQ sucessivos. A carta é elaborada para cada teste e para cada nível de controlo.

O primeiro passo consiste em calcular os limites de aceitação, esses limites são +/- 1DP, +/- 2DP, +/- 3DP da Média. O laboratório precisa de documentar que os testes de Controlo de Qualidade foram realizados. Assim, é necessário guardá-los em suporte informático ou em papel. Estes resultados devem acompanhar a carta de



controlo. A observação desta carta permite detetar erros sistemáticos e erros aleatórios.

Erros Sistemáticos:

Os erros sistemáticos são evidenciados pela alteração da média dos valores de controlo. A alteração pode ser gradual (tendências) ou abrupta (desvios).

A tendência indica uma perda gradual de fiabilidade no processo analítico, é normalmente subtil e tem como causas mais frequentes a deterioração da fonte luminosa do instrumento de medida, a acumulação gradual de “detritos” nos tubos de reagentes ou amostras, a acumulação gradual de “detritos” na superfície dos elétrodos, a idade” dos reagentes, a deterioração gradual de materiais, deterioração gradual da câmara de temperatura e a deterioração gradual da integridade do filtro de luz

Os desvios são mudanças abruptas nos valores médios do controlo e são causados por falhas repentinas ou mudanças da fonte luminosa, modificações na preparação do reagente, mudança no lote de reagentes, manutenção do equipamento, falhas repentinas na temperatura e falha no sistema de pipetagem.

Para avaliar as cartas de controlo podemos utilizar como base as regras de Westgard, as quais podem ser usadas individualmente ou combinadas:

A violação de qualquer uma das seguintes regras não requer necessariamente uma rejeição do processo analítico, apenas identifica pequenos erros sistemáticos que não têm relevância ou significado clínico.

Regra 1_{2DP} - Uma observação de controlo que exceda a média ± 2 DP, mas não ultrapasse ± 3 DP é considerada apenas como um alarme. Aconselha-se a estar atento aos resultados posteriores. Os resultados dos doentes podem ser validados.

Regra 3_{1DP} - Três resultados consecutivos maiores que $1s$ mas menores que ± 2 DP, do mesmo lado da média. Erro sistemático.

Regra 4_{1DP} – Quatro resultados consecutivos maior que 1 DP mas menor que ± 2 DP, do mesmo lado da média: Erro sistemático O uso de Regra 3_{1DP} deteta mais precocemente estes erros.

Regra 10X - Regra combinada de 10 observações consecutivas maior que 1 DP mas menor que ± 2 DP, do mesmo lado da média: Erro sistemático. Pode ser também aplicada para 7, 8, 9 ou 12 resultados consecutivos do mesmo lado da Média.



A violação de qualquer uma das regras seguintes põe em causa todo processo analítico em curso e obriga a executar novas determinações do controlo e das amostras depois de selecionado o erro.

Regra 1_{3DP} - Uma observação de controlo que exceda a média +/- 3DP

Sensível ao erro fortuito. Começo de um erro sistemático

Regra 2_{2DP} - Este erro identifica unicamente um erro sistemático

O critério de violação é: Dois resultados consecutivos de CQ que excedam os limites da média +/- 2DP, mas não o limite +/- 3DP do mesmo lado da média

Regra R_{4DP} – Esta regra deteta um erro fortuito e é aplicada apenas quando na mesma corrida se utilizam dois níveis de controle diferentes e quando a diferença entre eles é de 4DP, por exemplo o nível de controlo normal posiciona-se no -2DP e o nível de controlo anormal no +2DP¹.

OLYMPUS AU 400

O controlo de qualidade deste aparelho é feito diariamente. Faz-se um controlo geral, com dois níveis (baixo, alto), um controlo de qualidade específico para HDL/LDL também com dois níveis, e um controlo de nível médio, de nome “ITA” (Olympus Integrated Technologies América, Inc. – Organização especializada nos produtos Olympus), que serve para monitorizar o desempenho analítico de determinados reagentes do aparelho. Faz-se também diariamente a calibração do ionograma, mas também existe um calibrador geral (soro humano com aditivos químicos de origem animal e vegetal) e calibradores específicos para determinadas determinações, como: APO A1 e APO B, ASO, PCR, HDL, LDL, microalbuminúria e RF, que se usam caso o controlo de qualidade dê fora do intervalo + 1 desvio padrão /- 1 desvio padrão, ou então quando se muda o lote de reagentes dos testes.

AUTION MAX AX – 4280

O controlo de qualidade deste aparelho tem dois níveis, o 1 e 2 (alto e baixo) e os níveis são feitos alternadamente. A calibração é realizada de 15 em 15 dias.

ADVIA CENTAUR

Este equipamento apresenta três níveis de controlo que são utilizados para a maioria das técnicas de forma alternada. Existem também controlos específicos para os marcadores tumorais (3 níveis, usados alternadamente), para a Paratormona (3 níveis,



usados alternadamente), para os anticorpos antitiroideus (2 níveis, usados alternadamente) e para os marcadores infecciosos da hepatite B e C (2 níveis, usados alternadamente).

A calibração das técnicas é efetuada aquando a mudança do lote de reagentes e sempre que o controlo de qualidade esteja fora dos limites considerados aceitáveis.

VIDAS

O controlo de qualidade deste aparelho vem incluído na embalagem Vidas de cada teste. Controlo esse que é realizado na abertura de cada nova embalagem para verificar a ausência de alterações dos reagentes e cada calibração deve ser também verificada utilizando este controlo.

A calibração é realizada na receção de cada novo lote e todos os 14 dias.

MINICAP

Neste aparelho é feito um controlo de qualidade todos os dias, este controlo tem apenas um nível, o nível médio.

SYSMEX XT 180i

O controlo de qualidade neste aparelho é feito diariamente, alternando os dias com três níveis de controlo: um baixo, um médio e um alto. O controlo de qualidade externo é feito 3 vezes por ano.

SYSMEX CA 500

Neste equipamento o controlo é feito todos os dias, com amostras do dia anterior, exceto à segunda-feira, em que é efetuado um controlo de qualidade comprado ao fornecedor, consiste em dois níveis, um alto e um baixo e é feito alternadamente a cada semana. O controlo de qualidade externo é feito uma vez por ano.

ADAMS A1C HA8160

O controlo de qualidade interno é feito todos os dias com controlo de qualidade comprado ao fornecedor, estes controlos têm dois níveis, um alto e um baixo, e são feitos alternadamente. O controlo de qualidade externo é feito uma vez por ano.

VESMATIC 30/30 PLUS

Neste aparelho utiliza-se um controlo interno do fornecedor, que é realizado todos os dias, apresenta dois níveis, um normal e outro patológico, esses dois níveis são efetuados em simultâneo todos os dias. O controlo de qualidade externo é feito uma vez por ano.

HB GOLD

No aparelho da eletroforese de hemoglobinas não se realiza controlo de qualidade interno, é apenas feito um controlo de qualidade externo uma vez por ano.



A Avaliação Externa da Qualidade é constituída por um organismo exterior que procede à avaliação da qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório. Neste laboratório usa-se o AEFA (Associação Espanhola de Farmacêuticos Analistas), que é realizado mensalmente na maioria das determinações.

CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO TÉCNICA

A validação técnica consiste em validar a execução técnica, os reagentes, os equipamentos e as amostras. Os resultados, após a calibração, a verificação da calibração e a validação do controlo de qualidade são validados um a um. Se algum resultado levantar dúvidas ou se se incluir em critérios de exclusão pré-definidos, como por exemplo, uma discrepância com valores anteriores ou fora de limites definidos pelo laboratório, este é sujeito a confirmação.



CONCLUSÃO

A realização deste estágio foi uma experiência enriquecedora, pois permitiu-me aprofundar os conhecimentos adquiridos nas áreas de Bioquímica, Imunologia e Hematologia e posso afirmar que atingi os objetivos.

As principais atividades profissionais consistiram em:

- Realização de colheitas e restantes atividades da fase pré-analítica;
- Testar e controlar os métodos usados na execução das análises;
- Colaborar na qualidade técnica e instrumental;
- Providenciar a boa manutenção dos equipamentos;
- Executar as análises Bioquímicas, Imunológicas e Hematológicas;
- Efetuar a validação técnica dos resultados.

Assim, estou convicta de que este estágio me trará bons frutos ao longo do meu percurso profissional.



BIBLIOGRAFIA

1. Apontamentos das aulas de Integração Profissional – Licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública;
2. Apontamentos das aulas de Bioquímica – Mestrado em Análises Clínicas e Licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública;
3. Apontamentos das aulas de Imunologia - Mestrado em Análises Clínicas e Licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública;
4. Apontamentos das aulas de Hematologia - Mestrado em Análises Clínicas e Licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública;
5. Bulas Fornecidas pelo Laboratório Nova Era dos equipamentos de Bioquímica, Imunologia e Hematologia;
6. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais, 19ª Edição - Henry, John B. – Brasil, Manole, 1999;
7. Dicionário Escolar do Corpo Humano - Burnie, David - Círculo de Leitores, 1996;
8. Guia Prático Climepsi de Análises clínicas - Caquet, René – Lisboa, Climepsi Editores, 2004;
9. Guia Prático Climepsi de Imunologia Geral - Letonturier, Philippe – Lisboa, Climepsi Editores, 2004;
10. Imunologia Celular e Molecular – Abbas, Abul K.; Lichtman, A. H.; Pober, J.S. – Brasil, Revinter, 2003;
11. Manuais dos aparelhos de Bioquímica, Imunologia e Hematologia;
12. Manual de colheitas do Laboratório Nova Era;
13. Manual de Técnicas do Laboratório Nova Era;
14. Tietz Fundamentos de Química Clínica, 4ª. Edição - Burtis, Carl A.; Ashwood, Edward R. - Brasil, Guanabara Koogan, 1998;
15. Widmann Interpretação clínica dos exames laboratoriais, 11º Edição - Sacher, Ronald A.; Mc Pherson, Richard – Brasil, Manole, 2002;

WEBGRAFIA

16. <http://www.psiqweb.med.br/gloss/dica.htm>;
17. http://www.priberam.pt/dlpo/definir_resultados.aspx;
18. <http://www.pt.wikipedia.org/wiki/anticoagulante>;



-
19. <http://www.mdsaude.com/2009/08/exame-de-urina.html#ixzz1hv9yHxre>;
 20. http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0212144_06_cap_02.pdf;
 21. <http://www.sergiofranco.com.br/bioinforme/index.asp?cs=Bioquimica&ps=eletroforeseProteinasSericas>;
 22. http://www.gendiag.com.br/nossos_produtos/pesquisa/RVR-CO100;
 23. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Hematologia>;